

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

L'INFECTION MIXTE STREPTO-DIPHTÉRIQUE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

par G. RAMON et M. DJOURICHITCH.

E. Roux et A. Yersin ont montré les premiers, dès 1890, que chez l'animal d'expériences le streptocoque exalte la virulence du bacille diphtérique. « Séparés, les cocci de l'érysipèle et le « microbe de la diphtérie atténue étaient incapables de donner « la mort aux cobayes; associés, ils les tuent rapidement avec « les lésions de la diphtérie. »

Dans la suite, de nombreux cliniciens et microbiologistes (Barbier, L. Martin, Sevestre et L. Martin, von Schreiber, Gibier, De Blasi et Russo-Travali, Papacostas, Gaté et Billa, Zoeller, Goldie, etc.) ont étudié l'association du bacille diphtérique et du streptocoque soit chez le malade lui-même, soit dans les cultures *in vitro*, soit chez l'animal d'expériences, et ont émis différentes hypothèses pour interpréter les faits observés.

Nous avons repris expérimentalement le sujet, en nous aidant de techniques nouvelles et en nous proposant d'examiner les différents facteurs qui peuvent intervenir dans l'association strepto-diphthérique.

Dans les essais que nous allons exposer, l'animal d'expériences est le cobaye du poids de 250 à 275 grammes.

Nous avons toujours employé la même souche de bacille diphtérique (souche P. R.), récemment isolée d'un cas de diphtérie maligne et qui fait preuve, chez le cobaye, d'un pouvoir pathogène relativement élevé.

Le matériel d'infection, en ce qui concerne le bacille de Löffler, est ainsi préparé (1) : la souche diphtérique estensemencée sur toute la surface d'un tube de sérum coagulé (22 millimètres de diamètre). Après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve, l'enduit microbien recouvrant la surface du tube est raclé et émulsionné dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. Des doses variables de cette émulsion sont injectées, sous la peau du cobaye, soit seules, soit en mélange avec le streptocoque ou d'autres germes, selon les besoins de l'expérience.

INFLUENCE COMPARÉE DE DIVERSES SOUCHES DE STREPTOCOQUES
ET DU STAPHYLOCOQUE SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE
DU BACILLE DIPHTÉRIQUE.

Dans cette série d'expériences, nous avons employé en association avec le bacille diphtérique, d'une part différentes souches de streptocoques d'origines diverses, d'autre part une souche de staphylocoque doré. Les souches de streptocoques sontensemencées soit dans le bouillon T, soit dans le milieu tel que le prépare l'un de nous pour la production de la toxine diphtérique ; elles ne sont pas pathogènes pour le cobaye aux doses utilisées.

Dans une première expérience, 19 cobayes reçoivent, sous la peau, différentes doses de l'émulsion de bacilles diphtériques (souche P. R.), (préparée comme il a été dit), additionnées ou non de quantités variables de streptocoques (culture de vingt-quatre heures, en bouillon, de la souche angine).

12 autres cobayes reçoivent les mêmes doses de l'émulsion diphtérique, mais en mélange avec des quantités variées de la souche de staphylocoque (culture de vingt-quatre heures en bouillon).

(1) Selon la technique imaginée par l'un de nous et utilisée depuis plusieurs années pour la détermination du pouvoir pathogène du bacille diphtérique. Voir G. RAMON, R. DEBRÉ, P. THIROLIX. *C. R. Soc. de Biol.*, **105**, 1930, p. 359.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE strepto-angine en cent. cubes	RÉSULTATS
1		Mort en 24 heures.
1/10		Mort en 36 heures.
1/30		Mort en 48 heures.
1/100		Survit avec escarre.
1/300		Survit avec escarre.
1	1	Mort en 36 heures.
1	1/10	Mort en 36 heures.
1/10	1	Mort en 2 jours.
1/10	1/10	Mort en 4 jours.
1/30	1	Mort en 2 jours.
1/30	1/10	Mort en 2 jours.
1/100	1	Mort en 2 jours.
1/100	1/10	Mort en 2 jours.
1/300	1	Mort en 4 jours.
1/300	1/10	Survit avec escarre.
1/1.000	1	Mort en 3 jours.
1/1.000	1/10	Mort en 4 jours.
0	1	Survit.
0	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE staphylocoque en cent. cubes	RÉSULTATS
1	1	Mort en 36 heures.
1	1/10	Mort en 36 heures.
1/10	1	Mort en 5 jours.
1/10	1/10	Mort en 3 jours.
1/30	1	Survit.
1/30	1/10	"
1/100	1	"
1/100	1/10	"
1/300	1	"
1/300	1/10	"
1/1.000	1	"
1/1.000	1/10	"
0	1	"
0	1/10	"

L'examen de ce tableau nous montre que l'émulsion de bacilles diphtériques, injectée seule, tue le cobaye à la dose de 1/30 de centimètre cube ; additionnée de streptocoques, elle tue le cobaye à la dose beaucoup plus faible de 1/1.000 de centimètre cube, mélangée au staphylocoque elle n'amène la mort du cobaye qu'à la dose de 1/10 de centimètre cube. L'autopsie

TABLEAU II.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE streptocoques en cent. cubes	RÉSULTATS
1/30	0	Mort en 2 jours 1/2.
1/30	0	Mort en 3 jours.
1/100	0	Survit.
1/100	1/3	Mort en 36 heures.
1/100	1/10	Mort en 2 jours.
1/300	1/3	Mort en 4 jours.
1/300	1/10	Mort en 7 jours.
1/1.000	1/3	Survit.
1/1.000	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE strepto-érysipèle en cent. cubes	RÉSULTATS
1/100	1/3	Mort en 2 jours.
1/100	1/10	Mort en 2 jours.
1/300	1/3	Mort en 2 jours.
1/300	1/10	Survit.
1/1.000	1/3	Survit.
1/1.000	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE strepto-puerpérale en cent. cubes	RÉSULTATS
1/100	1/3	Mort en 2 jours.
1/100	1/10	Mort en 4 jours.
1/300	1/3	Survit.
1/300	1/10	Survit.
1/1.000	1/3	Survit.
1/4.000	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE strepto-gourme en cent. cubes	RÉSULTATS
1/100	1/3	Mort en 2 jours.
1/100	1/10	Mort en 2 jours.
1/300	1/3	Mort en 2 jours.
1/300	1/10	Survit.
1/1.000	1/3	Survit.
1/1.000	1/10	Survit.

des animaux morts après inoculation du mélange strepto-diphthérique décèle les lésions typiques de la toxi-infection diphthérique.

Ainsi, comme l'ont établi déjà plusieurs auteurs, le streptocoque non pathogène par lui-même, injecté en mélange avec le bacille diphtérique, augmente dans de fortes proportions le pouvoir pathogène de ce dernier; le staphylocoque semble par contre l'atténuer.

Ayant confirmé l'action favorisante du streptocoque sur le pouvoir pathogène du bacille de Löffler, nous avons examiné comparativement, et dans des conditions analogues aux précédentes, l'influence de souches de streptocoques d'origines diverses : angine, érysipèle, fièvre puerpérale, gourme du cheval. (Tableau II.)

D'après les résultats exposés dans le tableau II, le streptocoque de la souche puerpérale rend l'association strepto-diphthérique sensiblement moins pathogène que les streptocoques ayant une autre origine; la souche la plus active à cet égard est celle isolée de l'angine.

L'INFECTION STREPTO-DIPHTÉRIQUE CHEZ LES ANIMAUX VACCINÉS AU MOYEN DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE.

Déjà nous avons noté que les cobayes morts à la suite de l'injection du mélange de bacilles diphtériques et de streptocoques présentent les lésions typiques d'intoxication diphtérique. C'est donc bien, semble-t-il, l'action pathogène du bacille diphtérique qui est exaltée par la présence du streptocoque. Nous allons en apporter une nouvelle preuve en injectant le mélange strepto-diphthérique à des cobayes préalablement vaccinés au moyen de l'anatoxine diphtérique.

Des cobayes qui ont été vaccinés un mois auparavant à l'aide de l'anatoxine diphtérique, et dont le sérum recèle, au centimètre cube, une quantité d'antitoxine correspondant à 0,3 unité antitoxique, reçoivent sous la peau des doses relativement élevées de mélanges d'émulsion diphtérique (souche P. R.) et de culture de streptocoques d'origines variées. Dans l'une des expériences, on substitue, au streptocoque, le staphylocoque.

On trouvera, dans le tableau III, les détails et les résultats de cette expérience.

Ce tableau nous l'indique, les cobayes immunisés à l'égard

TABLEAU III.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE streptocoques en cent. cubes	RÉSULTATS
<i>a) Cobayes vaccinés au moyen de l'anatoxine diphtérique.</i>		
1	0	Survit.
1	0	Survit.
1/10	0	Survit.
1/14	0	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE STREPTO souche angine en cent. cubes	RÉSULTATS
1	1	Survit.
1	1/3	Survit.
1	1/10	Survit.
1/10	1	Survit.
1/10	1/3	Survit.
1/10	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE STREPTO souche érysipèle en cent. cubes	RÉSULTATS
1	1/3	Survit.
1	1/10	Survit.
1/10	1/3	Survit.
1/10	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE STREPTO souche puerpérale en cent. cubes	RÉSULTATS
1	1/3	Survit.
1	1/10	Survit.
1/10	1/3	Survit.
1/10	1/10	Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE STREPTO souche gourme en cent. cubes	RÉSULTATS
1	1/3	Survit.
1	1/10	Survit.
1/10	1/3	Survit.
1/10	1/10	Survit.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE staphylocoques en cent. cubes	RÉSULTATS
1	1	Survit.
1	1/10	Survit.
1/10	1	Survit.
1/10	1/10	Survit.

b) Cobayes neufs témoins.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE streptocoques en cent. cubes	RÉSULTATS
1		Mort en 24 heures.
1/10		Mort en 36 heures.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE souche angine en cent. cubes	RÉSULTATS
	1	Survit.
	1/3	Survit.
	1/10	Survit.
1	1	Mort en 24 heures.
1/10	1/3	Mort en 48 heures.

de l'intoxication diphtérique résistent parfaitement à l'infection mixte strepto-diphthérique qui tue les cobayes non vaccinés. C'est donc, sans aucun doute, l'action pathogène du bacille diphtérique qui est accrue, grâce à son association avec le streptocoque. L'infection strepto-diphthérique n'entraîne la formation d'aucun produit toxique en dehors du poison diphtérique.

Cette expérience et ses résultats permettent, en outre, de se rendre compte que le sujet solidement immunisé au moyen de l'anatoxine diphtérique n'a rien à craindre de l'association possible du bacille diphtérique et du streptocoque. C'est seulement chez des sujets possédant une immunité relativement peu élevée, « à la limite », que l'infection due au bacille de Löffler, exaltée par son association avec le streptocoque, pourrait, dans une certaine mesure, triompher de la barrière trop faible qui lui est spécifiquement opposée.

**DE L'INFLUENCE DE DIVERS PRODUITS STREPTOCOCCIQUES
SUR LA TOXI-INFECTION DIPHTÉRIQUE.**

Jusqu'ici, nous avons étudié l'infection mixte due à l'association du bacille diphtérique et du streptocoque. Qu'adviert-il lorsque, au streptocoque vivant, on substitue le même germe tué ou simplement le bouillon streptococcique débarrassé de ses germes par filtration?

Des cobayes sont injectés avec des mélanges constitués au moyen de doses variables de bacilles diphtériques vivants et d'une dose fixe (1 centicube d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon) de streptocoques (souche angine) chauffée à 100° pendant cinq minutes.

D'autres cobayes reçoivent l'émulsion de bacilles diphtériques additionnée d'une dose fixe (1 cent. cube) de filtrat d'une culture de trois jours de streptocoques (souche angine).

Les résultats de ces deux expériences sont exposés dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	BOUILLON non ensemencé en cent. cubes	RÉSULTATS
1/30 1/400 1/3.000	1 1 4	Mort en 48 heures. Mort en 4 jours. Survit.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	FILTRAT STREPTOCOCCIQUE en cent. cubes	RÉSULTATS
1/100 1/300 1/1.000 1/3.000	1 1 1 1	Mort en 2 jours. Mort en 5 jours. Mort en 4 jours. Mort en 7 jours.
ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	STREPTOCOQUES TUÉS en cent. cubes	RÉSULTATS
1/100 1/300 1/1.000 1/3.000	1 1 1 1	Mort en 36 heures. Mort en 2 jours. Mort en 5 jours. Mort en 8 jours.

Nous constatons à l'examen de ce tableau que les streptocoques tués et les substances contenues dans le bouillon streptococcique filtré augmentent l'action pathogène du bacille diphtérique comme les streptocoques vivants eux-mêmes. Cet effet n'est donc pas exclusivement lié à l'activité vitale du streptocoque.

L'INJECTION SIMULTANÉE, MAIS EN DEUX ENDROITS DIFFÉRENTS,
 DU BACILLE DIPHTÉRIQUE ET DU STREPTOCOQUE
 PRODUIT-ELLE LES MÊMES EFFETS
 QUE L'INJECTION DU MÉLANGE DES DEUX GERMES?

Une question qui vient naturellement à l'esprit est celle-ci : peut-on obtenir l'accroissement de l'action pathogène du bacille diphtérique par le streptocoque en injectant chacun des deux germes, non plus en mélange, mais en deux endroits séparés du corps de l'animal?

Pour répondre à cette question, une série de cobayes est soumise à l'inoculation de telle façon que chaque cobaye reçoit sous la peau, en deux points différents, d'une part l'émulsion diphtérique, d'autre part la culture streptococcique. Des animaux témoins reçoivent comme d'ordinaire le mélange des deux microbes.

Voici (tableau V), avec le schéma de l'expérience, ses résultats :

TABLEAU V.

ÉMULSION DIPHTÉRIQUE (souche P. R.) en cent. cubes	CULTURE strepto-angine en cent. cubes	ENDROITS	RÉSULTATS
1/100	1/2	2	Survit.
1/300	1/2	2	Survit.
1/100	1/2	2	Survit.
1/100	1/2	1	Mort en 36 heures.
1/300	1/2	1	Mort en 7 jours.
1/1.000	1/2	1	Survit.

Ainsi, la coexistence au même endroit du streptocoque et du bacille diphtérique est nécessaire pour que l'effet pathogène de ce dernier soit augmenté. Cela nous porte à croire que le streptocoque n'agit vraisemblablement pas sur l'organisme tout

entier, mais sur le terrain local, au lieu d'injection du mélange, pour le rendre plus favorable au développement du bacille de Löffler et à la production de la toxine diphtérique.

INFLUENCE DES PASSAGES, EN PRÉSENCE DU STREPTOCOQUE,
SUR LA QUALITÉ PATHOGÈNE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE.

Nous avons recherché si le caractère pathogène intrinsèque du bacille diphtérique est modifié par des passages successifs chez l'animal, en présence du streptocoque.

Après avoir injecté, à des cobayes, le mélange de bacilles diphtériques (souche P. R.) et de streptocoques (souche angine) nous isolions chez l'un de ceux qui succombaient à l'infection mixte le germe diphtérique, nous le remettions en culture et l'injections à nouveau à d'autres animaux en mélange avec le streptocoque et ainsi de suite. Nous avons ainsi effectué dix passages en association avec le streptocoque; nous donnons les résultats (résumés) de cette série d'expériences dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

BACILLE DIPHTÉRIQUE	STREPTOCOQUES en cent. cubes	POUVOIR PATHOGÈNE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE de passage, en injections mixtes					
		1	1/100	1/300	1/1.000	1/3.000	1/6.000
Souche originale . .	1	Mort.	36 h.	2 j.	2 j.	3 j.	5 j.
Souche 1 ^{er} passage.	1	Mort.	2 j.	2 j.	2 j.	3 j.	Survit.
Souche 2 ^e passage.	1	Mort.	36 h.	36 h.	3 h.	2 j.	2 j.
Souche 6 ^e passage.	1	Mort.	36 h.	2 j.	2 j.	2 j.	4 j.
Souche 8 ^e passage.	1	Mort.	2 j.	2 j.	3 j.	Survit.	Survit.
Souche 9 ^e passage.	1	Mort.	2 j.	2 j.	2 j.	3 j.	3 j.
Souche 10 ^e passage.	1	Mort.	2 j.	2 j.	2 j.	3 j.	Survit.

En tenant compte des variations inévitables, d'une expérience à l'autre, on se rend compte, en examinant ce tableau, que si le premier passage en présence du streptocoque augmente le pouvoir pathogène du bacille diphtérique, cette augmentation ne progresse pas sensiblement par les passages successivement effectués en association avec le streptocoque. Remarquons que, dans ces expériences, l'action pathogène du germe diphtérique

associé au streptocoque se montre particulièrement développée ; nous avons constaté qu'en général l'influence de la présence du streptocoque est plus marquée lorsque l'on ajoute à l'émulsion diphtérique une dose de streptocoques plus élevée.

Les souches de bacilles diphtériques du deuxième au dixième passage, injectées seules (sans streptocoques), se montrent considérablement moins pathogènes qu'en association avec le streptocoque. Néanmoins il semblerait, d'après le tableau VII, que le pouvoir pathogène de ces souches de passage se montre en général un peu plus élevé que celle de la souche originale.

TABLEAU VII.

BACILLE DIPHTÉRIQUE	POUVOIR PATHOGÈNE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE de passage, injecté seul		
	1/30 cent. cube	1/100 cent. cube	1/300 cent. cube
Souche originale	Mort en 36 h.	Survit.	Survit.
Souche 1 ^{er} passage	Mort en 36 h.	Mort en 36 h.	Survit.
Souche 2 ^e passage	Mort en 24 h.	Mort en 36 h.	Mort en 4 j.
Souche 3 ^e passage	Mort en 36 h.	Mort en 3 j.	Survit.
Souche 4 ^e passage	Mort en 36 h.	Mort en 11 j.	Mort en 6 j.
Souche 5 ^e passage	Mort en 3 j.	Survit.	Survit.
Souche 6 ^e passage	Mort en 36 h.	Mort en 2 j.	Survit.
Souche 7 ^e passage	Mort en 48 h.	Survit.	
Souche 8 ^e passage	Mort en 24 h.	Mort en 2 j.	Survit.
Souche 9 ^e passage	Mort en 36 h.	Mort en 2 j.	Survit.
Souche 10 ^e passage	Mort en 36 h.	Mort en 36 h.	Survit.

Mais nous sommes tentés de voir là l'effet des variations expérimentales bien plutôt qu'une modification réelle de la qualité pathogène du germe diphtérique, sous l'influence des passages. Dans cette dernière alternative, en effet, la modification du caractère pathogène devrait s'accentuer avec les passages, or il n'en est rien.

INFLUENCE DES PASSAGES, EN PRÉSENCE DE STREPTOCOQUES, SUR LE POUVOIR TOXIGÈNE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE.

Nous avons, pour étudier cette question,ensemencé les souches diphtériques ayant subi un ou plusieurs passages avec le streptocoque, dans le bouillon préparé par l'un de nous pour la production de la toxine diphtérique (bouillon glucosé addi-

tionné d'acétate de soude). Le filtrat de la culture de neuf jours est examiné au double point de vue de son pouvoir flocculant et de son pouvoir toxique chez le cobaye. En même temps et à titre d'essai témoin (1), la souche originale est ensemencée dans le même bouillon, et le même filtrat de la culture de neuf jours est également soumis aux mêmes épreuves *in vitro* et *in vivo*. Voici dans le tableau VIII les résultats obtenus.

TABLEAU VIII.

BACILLE DIPTÉRIQUE	POUVOIR flocculant en unités	POUVOIR TOXIQUE CHEZ LES COBAYES		
		1/50 cent. cube	1/100 cent. cube	1/150 cent. cube
Souche originale .	2,5	Mort en 36 h.	Mort en 48 h.	Mort en 6 j.
Souche 3 ^e passage.	2	Mort en 36 h.	Mort en 48 h.	Survit.
Souche originale .	2,8	Mort en 24 h.	Mort en 48 h.	Mort en 48 h.
Souche 5 ^e passage.	1,4	Mort en 36 h.	Mort en 48 h.	Mort en 5 j.
Souche originale .	2,8	Mort en 36 h.	Mort en 36 h.	Mort en 48 h.
Souche 7 ^e passage.	0,7	Mort en 4 j.	Survit.	Survit.
Souche originale .	2	Mort en 48 h.	Mort en 48 h.	Survit.
Souche 8 ^e passage.	1,4	Mort en 48 h.	Mort en 3 j.	Survit.
Souche originale .	2	Mort en 48 h.	Mort en 2 j.	Survit.
Souche 9 ^e passage.	1,2	Mort en 36 h.	Survit.	Survit.

Ainsi, l'activité des toxines diptériques que fournissent les souches de passage avec le streptocoque se révèle toujours moindre que celle des toxines obtenues dans le même bouillon avec la souche diptérique originale. Les passages avec le streptocoque n'accroissent donc pas la capacité toxique du bacille diptérique, mais au contraire semblent la diminuer progressivement.

Notons ici que le bacille diptérique (souche P. R.) ayant fait plusieurs passages chez le cobaye, sans streptocoques cette fois, présente elle aussi une diminution sensible de sa faculté toxigène (tableau IX). Nous avons constaté le même fait pour d'autres souches, la souche Park et Williams par exemple.

Contrairement à l'opinion de divers auteurs, il n'est donc pas possible d'exalter la qualité toxigène du bacille diptérique par passages sur le cobaye. Le seul moyen que l'on ait encore à

(1) Ces essais permettaient en effet d' « établir » le bouillon de culture, la production de toxine pouvant être variable d'un échantillon de bouillon à l'autre.

TABLEAU IX.

BACILLE DIPHTÉRIQUE	POUVOIR TOXIQUE DU FILTRAT CHEZ LES COBAYES			
	1/75 cent. cube	1/100 cent. cube	1/125 cent. cube	1/150 cent. cube
Souche originale .	Mort en 3 j.	Mort en 10 j.	Mort en 4 j.	Mort en 7 j.
Souche 3 ^e passage.	Mort en 4 j.	Survit.	Survit.	Survit.
Souche originale .	Mort en 3 j.	Mort en 3 j.	Mort en 5 j.	Mort en 6 j.
Souche 10 ^e passage.	Mort en 9 j.	Mort en 8 j.	Survit.	Survit.

l'heure actuelle d'améliorer la production de toxine, *in vitro*, est celui qui consiste à perfectionner le milieu de culture, ce que nous avons réalisé au cours de ces dernières années, faisant passer la valeur de la toxine et de l'anatoxine diphtérique de 8 à 15, puis à 20 et enfin à 30 et 40 unités antigènes.

LE MÉCANISME DE LA STIMULATION DE L'ACTION PATHOGÈNE
DU BACILLE DIPHTÉRIQUE
DANS L'INFECTION MIXTE STREPTO-DIPHTÉRIQUE.

Les expériencés que nous venons d'exposer démontrent que le streptocoque ou les produits microbiens qui en dérivent, injectés à l'animal d'expériences, en mélange avec le bacille diphtérique, n'agissent pas directement sur ce dernier pour en modifier les propriétés; le pouvoir pathogène, le pouvoir toxigène, en tant que qualités intrinsèques et transmissibles du bacille diphtérique, ne sont pas accrus, nous l'avons vu, par l'action du streptocoque ou de ses dérivés. D'autre part, le streptocoque ne diminue pas la résistance générale de l'organisme animal qui a reçu le mélange strepto-diphtérique, au point de l'amener à succomber à des doses moindres du bacille diphtérique puisque, nous l'avons constaté, lorsque l'on inocule, en deux endroits différents, le streptocoque et le bacille de Löffler, l'animal succombe dans les mêmes conditions et aux mêmes doses de l'émulsion diphtérique que si celle-ci est injectée seule.

Nous sommes donc conduits à admettre une action indirecte du streptocoque permettant aux propriétés du bacille diphtérique de s'exercer avec plus d'intensité sans être pour cela

augmentées dans leur valeur intrinsèque. Le mécanisme de la stimulation nous apparaît semblable à celui que nous avons mis en évidence, dans des conditions analogues. Avec R. Debré et P. Thiroloix, nous avons, en effet, montré que l'addition de bouillon, ou mieux encore d'un peu de poudre de tapioca, à des dilutions de culture du bacille de Löffler, immédiatement avant leur injection au cobaye, augmente dans de fortes proportions leur action pathogène à tel point qu'une culture de bacilles diphthériques de vingt-quatre heures, qui, en dilution simple, fait périr le cobaye à la dose de 1/30 de centicube, peut tuer cet animal à la dose très réduite de 1/2.000 de centicube si la dilution est additionnée de bouillon et de tapioca, par exemple. C'est là exactement, semble-t-il, l'effet du streptocoque (1) qui, comme cela a été démontré pour le tapioca, agit au point d'injection en y provoquant des phénomènes locaux plus ou moins marqués, macroscopiques ou microscopiques. Le terrain local est rendu plus apte à la végétation du bacille diphthérique et celui-ci est ainsi mis à même de manifester, avec plus d'intensité, les propriétés pathogènes qui lui appartiennent en propre et que ne modifient ni le streptocoque, ni les produits streptococciques (2).

Ce que nous observons chez nos cobayes n'est-il pas l'image de ce qui se passe en clinique, dans la « strepto-diphthérie » ? Dans la gorge du sujet où sont associés le streptocoque et le bacille de Löffler, le streptocoque ou ses produits n'exercent aucune action directe sur le bacille diphthérique, ils agissent sur la muqueuse et les tissus sous-jacents pour apprivoiser là

(1) Tous les germes, substances microbiennes ou autres n'agissent pas de même façon que le streptocoque ou le tapioca, nous venons de le voir pour le staphylocoque.

(2) Nous avons également mis en évidence le même mécanisme en ce qui concerne la stimulation de l'immunité antitoxique sous l'influence des vaccins microbiens dans les « vaccinations associées ». Comme nous l'avons établi expérimentalement, le vaccin microbien, tel que le T. A. B. injecté en mélange avec l'anatoxine diphthérique (ou tétanique), n'augmente pas la valeur antigène intrinsèque de l'anatoxine, il n'intervient qu'en provoquant au point d'injection des phénomènes locaux plus ou moins accusés (congestion, inflammations locales, etc.), qui favorisent l'action de l'antigène anatoxique et amènent ainsi l'organisme à une meilleure production d'antitoxine. Voir en particulier : G. Ramon et M. Djourichitch : Recherches expérimentales sur les vaccinations associées. Ces *Annales*, 51, 1933, p. 407 et G. Ramon. *Bull. et Mém. de la Soc. centr. de Méd. vétér.*, 150, n° 10, 1925, n° 20, 1925; *C. R. Acad. des Sciences*, 181, 1925, p. 457; Ces *Annales*, 40, 1926, p. 1.

aussi le terrain local sur lequel le bacille diphtérique, se multiplie alors plus aisément et peut exercer plus intensément ses propriétés, d'où la gravité accrue de la diphtérie compliquée d'infection streptococcique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Injecté au cobaye en mélange avec le streptocoque, le bacille diphtérique amène la mort de l'animal à dose plus faible que s'il est injecté seul; l'association avec le streptocoque exalte donc l'action pathogène du bacille diphtérique. Cet effet peut être obtenu à divers degrés avec différentes souches de streptocoques (souche provenant d'angine, d'érysipèle, etc.), mais non avec le staphylocoque.

L'association strepto-diphthérique ne produit aucun symptôme pathologique chez les animaux immunisés au moyen de l'anatoxine diphtérique. Le sujet humain, solidement immunisé grâce à la vaccination anatoxique, n'a donc rien à craindre de l'association du bacille diphtérique et du streptocoque.

Le streptocoque tué par la chaleur, le filtrat de culture streptococcique, augmentent l'action pathogène du bacille diphtérique, injecté en même temps qu'eux, comme les streptocoques vivants eux-mêmes. L'effet stimulant n'est donc pas lié à l'activité vitale du streptocoque.

L'injection simultanée, mais en deux endroits différents, du streptocoque et du bacille diphtérique n'entraîne pas l'augmentation de l'effet pathogène de ce dernier. Ainsi, la coexistence, au même endroit, des deux microbes est nécessaire pour entraîner l'accroissement de l'action pathogène du bacille diphtérique.

Seul, le premier passage avec le streptocoque stimule l'action pathogène du bacille diphtérique, les passages successifs ne font qu'entretenir cette action au même degré. De même les passages avec le streptocoque n'accroissent pas le pouvoir toxigène du bacille diphtérique.

Le streptocoque (ou ses dérivés), injecté à l'animal d'expérience en association avec le bacille diphtérique, n'agit donc pas directement sur celui-ci pour en exalter les propriétés. Il intervient comme certaines substances ajoutées à l'émulsion

diphétique, le tapioca, par exemple, pour modifier le terrain local au point d'injection du mélange et le rendre plus apte à la culture du bacille diphétique. Les propriétés du bacille diphétique peuvent, dans ces conditions, se manifester d'une façon plus intense.

Tel apparaît le mécanisme de la stimulation de l'action pathogène du bacille diphétique dans l'infection mixte strepto-diphétique, chez l'animal d'expériences. Le même mécanisme joue vraisemblablement dans la « strepto-diphthérie », chez l'homme, et explique la gravité accrue de l'angine diphétique compliquée d'infection streptococcique.

ÉTUDE SUR LE SARCOME DE LA SOURIS

par A. BESREDKA et L. GROSS.

Depuis des années on est devant le dilemme : s'agit-il dans les cas de néoplasmes d'une greffe ou d'un virus? A côté de très rares biologistes qui croient à la nature infectieuse des tumeurs, la grande majorité est acquise à l'idée de la greffe. Les expériences que nous poursuivons et qui portent sur des milliers de souris sont-elles de nature à nous faire prendre position dans cette querelle des cancérologues?

* * *

Ehrlich a pu réunir 278 souris, toutes femelles, atteintes de carcinome spontané. Sur 108 essais de transplantation à des souris neuves, il a réussi à obtenir des résultats positifs 14 fois seulement. Au cours des passages, 3 tumeurs ont changé de structure : après avoir présenté des caractères mixtes de carcinome et de sarcome, elles se sont transformées en sarcome pur. C'est une de ces tumeurs, douée d'une grande virulence, qui nous a servi dans toutes les expériences.

Les anatomo-pathologistes ne sont pas d'accord aujourd'hui sur la nature de cette tumeur : tandis que les uns ne mettent pas en doute sa structure sarcomateuse (fig. 1), d'autres, non moins autorisés, sont d'avis qu'il s'agit d'un épithéliome. Ce qui importe pour nous, c'est sa nature maligne ; après des passages par les souris, l'inoculation sous la peau (0 gr. 025) est toujours suivie d'une tumeur ; les dimensions de celle-ci dépassent, après quelques semaines, celles de l'animal lui-même. Les métastases au niveau des ganglions lymphatiques s'observent rarement, surtout au stade ultime de la maladie ; des métastases dans les organes sont exceptionnelles.

VIRULENCE DE LA TUMEUR BROYÉE.

La tumeur est prélevée chez l'animal en état de narcose et coupée d'abord avec des ciseaux en petits fragments, puis triturée dans un mortier en présence d'une certaine quantité d'eau physiologique et transformée en une fine émulsion (fig. 2). Après une période d'incubation de huit à quatorze jours, pen-

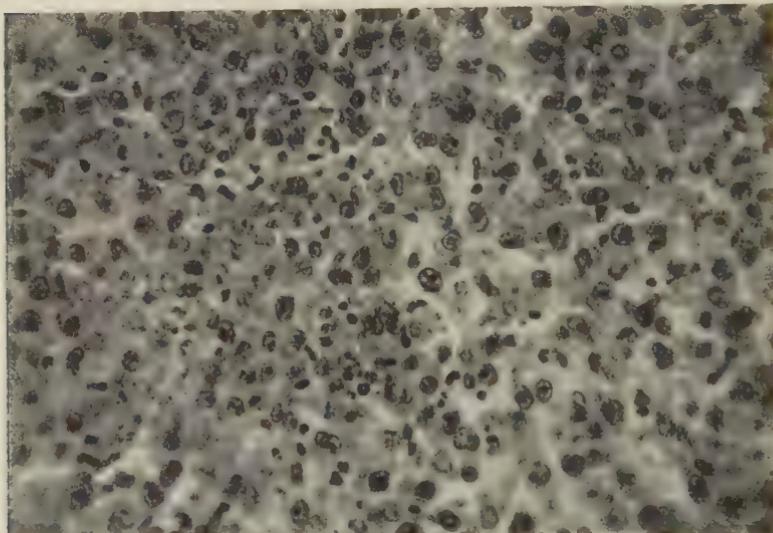


FIG. 1. — Sarcome d'Ehrlich. Gross. : 600 (1.).

dant laquelle l'animal a toutes les apparences de la santé, on voit apparaître, à la suite de l'inoculation sous-cutanée, une tuméfaction, laquelle augmente assez rapidement dans les huit ou douze jours qui suivent. Dès que la tumeur apparaît, l'issue mortelle est certaine, à une échéance plus ou moins longue. D'après les dosages, faits sur un grand nombre de souris avec différentes émulsions de tumeurs, la dose de 0 gr. 025-0 gr. 030 était toujours mortelle : il nous est arrivé quelquefois d'observer des résultats positifs avec des doses plus faibles (0,01-0,0075-0,001-0,0005).

(1) Toutes les photographies ont été faites par M. Jeantet à qui nous exprimons notre vive reconnaissance.

VIRULENCE DE LA TUMEUR BROYÉE ET AGITÉE.

Soumise à l'agitation en présence de billes de verre, la tumeur émulsionnée dans de l'eau physiologique subit une atténuation de virulence plus ou moins prononcée. Dans nos expériences, l'émulsion était laissée dans un agitateur électrique (700 à 1.000 mouvements par minute) pendant un temps variant de douze minutes à sept heures et demie. Suivant le

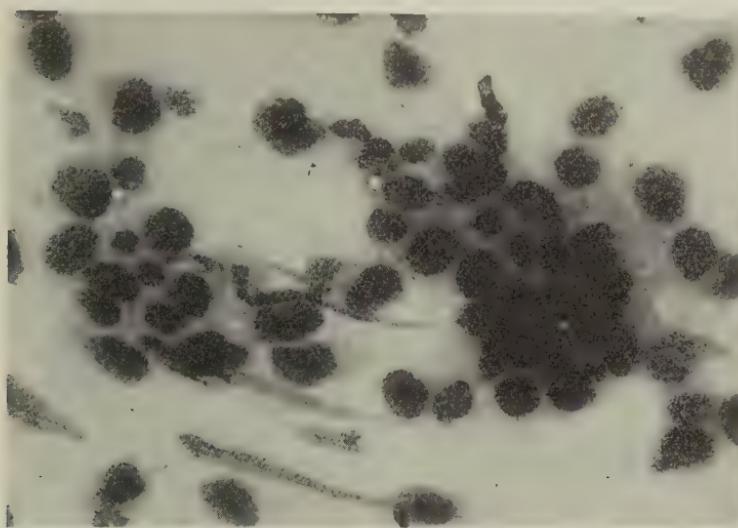


FIG. 2. — Emulsion sarcomateuse.

cas, la masse obtenue était inoculée en totalité ou après centrifugation ; dans ce dernier cas, nous injections soit la partie solide, soit la partie liquide. Déjà, après une heure d'agitation, on ne distinguait plus au microscope de cellules intactes : on était en présence d'une masse amorphe, homogène, composée de débris cellulaires (fig. 3).

Pour ce qui est de la virulence de la tumeur agitée, voici ce qui a été constaté. Après quinze minutes de séjour dans l'agitateur, le sarcome perd une partie de sa virulence ; cependant, si l'on injecte une forte dose, on obtient un sarcome dans la grande majorité des cas (sur 27 souris, le résultat fut négatif chez 2 seulement).

La virulence du sarcome se trouve plus atténuée après trente ou quarante minutes d'agitation : sur 8 souris auxquelles il a été inoculé une dose massive de bouillie sarcomateuse, le résultat fut positif sept fois. Chez les souris ainsi inoculées, la tumeur met plus longtemps à apparaître (quatre à cinq semaines) et son évolution est particulièrement lente. Dans une seule expérience cependant, après quarante minutes d'agitation, 6 souris inoculées avec une dose massive ont présenté, toutes, une tumeur après deux à trois semaines d'incubation.



FIG. 3. — Emulsion sarcomateuse après agitation.

La virulence du sarcome est fortement atténuée après l'agitation pendant une heure. Sur 5 souris auxquelles il a été inoculé une dose dix fois supérieure à la mortelle, une seule est restée indemne ; chez les 4 autres, la tumeur fit son apparition après quatre semaines. Dans une autre expérience qui a porté sur 3 souris, l'inoculation faite dans les mêmes conditions est restée négative.

Après une agitation de deux heures, il a été observé 3 cas positifs sur 39 souris. Après une agitation de plus de deux heures, le sarcome perd complètement sa virulence. Dans un cas seulement, pour une raison qui nous échappe, malgré une

agitation pendant quatre heures et demie, nous avons enregistré, chez 1 souris, un résultat positif : chez cet animal, qui a reçu



FIG. 4. — Adénocarcinome
après injection d'émulsion sarcomateuse centrifugée.

une dose massive, une petite induration apparut après trois semaines ; cette induration a mis longtemps (trois semaines) à se développer, après quoi son évolution est devenue rapide. Dans toutes les autres expériences — elles ont porté sur 60 souris —

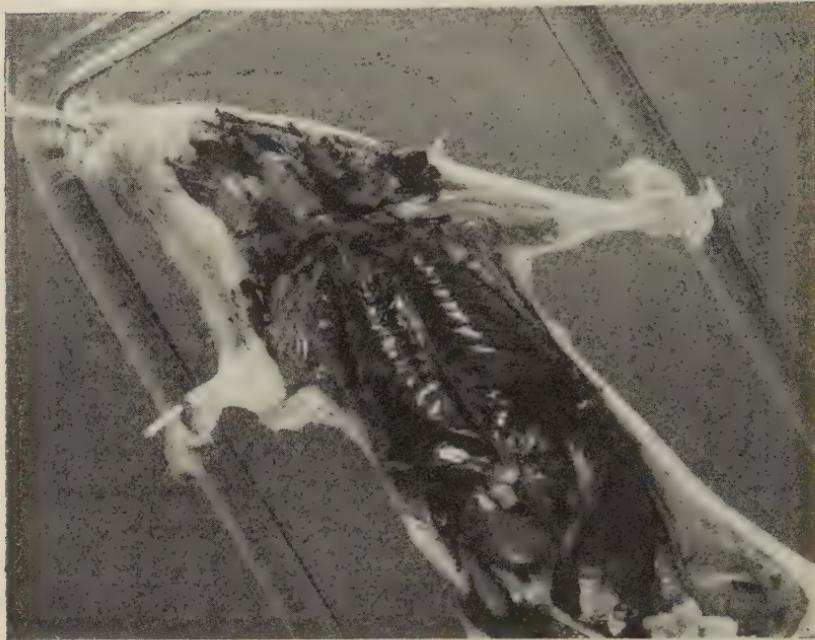


FIG. 5. — Adénocarcinome apparu soixante-dix-neuf jours après inoculation du filtrat du sarcome.

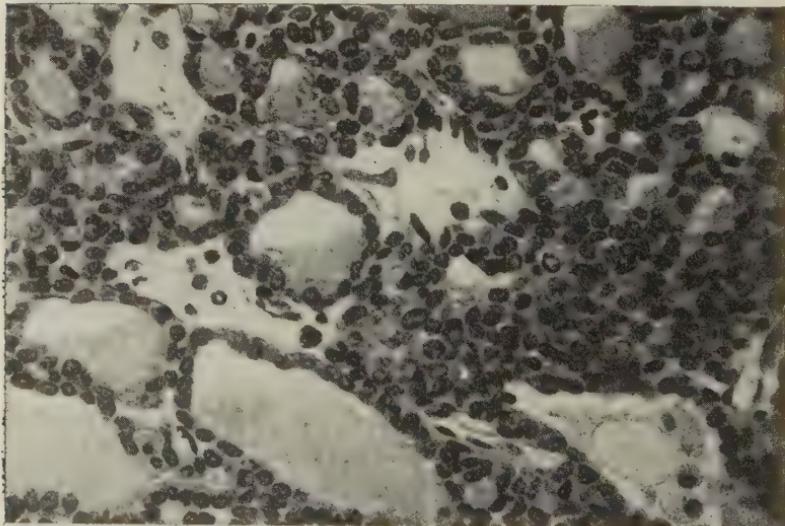


FIG. 6. — Adénocarcinome apparu soixante-dix-neuf jours après inoculation du sarcome (Bougie L t.).



FIG. 7. — Sarcome développé autour d'un sac en collodion contenant de la bouillie sarcomateuse.

les inoculations des sarcomes agités pendant trois à sept heures sont restées toujours négatives, malgré l'administration de doses dix fois supérieures à la dose mortelle.

L'inoculation dans la peau de l'émulsion sarcomateuse, agitée pendant deux ou trois heures, donne lieu à une réaction locale qui dure quinze jours. Notons en passant que les souris ainsi inoculées n'acquièrent pas l'immunité.

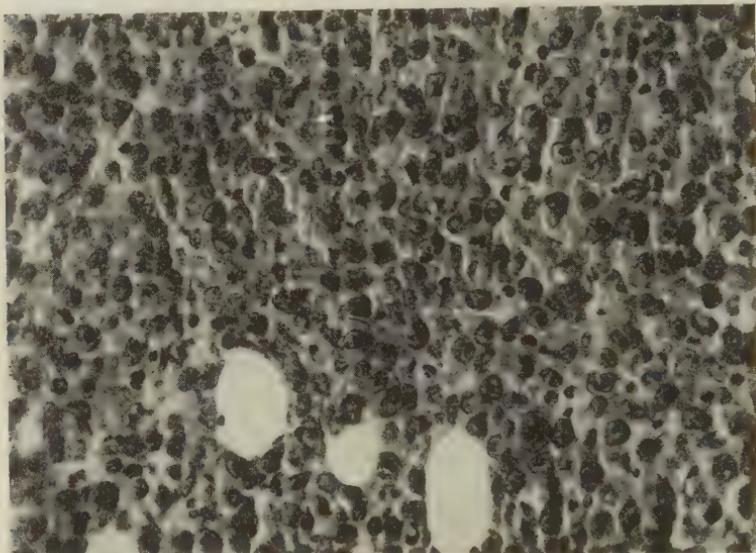


FIG. 8. — Sarcome autour d'un sac en collodion contenant de la bouillie sarcomateuse.

VIRULENCE DE LA TUMEUR BROYÉE, AGITÉE ET CENTRIFUGÉE.

Des tumeurs broyées étaient soumises à l'agitation pendant un temps variable, puis centrifugées (3.600 tours par minute). La partie surnageante, ne renfermant pas de cellules visibles au microscope, était injectée sous la peau à des souris neuves.

Voici quelques-unes de ces expériences, brièvement résumées :

EXPÉRIENCE I. — L'agitation de la tumeur pendant une demi-heure est suivie de centrifugation pendant le même laps de

temps. La partie liquide, aspirée dans une pipette, est injectée (0 c. c. 6) sous la peau à 2 souris. Après cinq semaines, on voit apparaître chez l'une d'elles un sarcome typique au niveau de l'inoculation ; l'autre souris reste indemne.

La partie solide, restée adhérente au tube, est délayée dans de l'eau physiologique et injectée sous la peau (0 c. c. 6) à



FIG. 9. — Sarcome après inoculation sous la peau.

2 souris ; après une incubation de six semaines, 1 souris présente un sarcome au niveau de l'inoculation.

EXPÉRIENCE II. — Tumeur agitée pendant quinze minutes et centrifugée pendant trente minutes. Injection du liquide surnageant à 2 souris. Mort de l'une après quarante jours et de l'autre après soixante jours, sans tumeur.

EXPÉRIENCE III. — Agitation pendant douze minutes, suivie de centrifugation pendant trente minutes. Injection du liquide

clair (1 c. c. 5) à 2 souris sous la peau : 1 souris (femelle) présente, après neuf jours, un adéno-carcinome inguinal avec kystes sanguins (fig. 4) ; l'autre est morte après trente-six jours sans tumeur. La partie inférieure, obtenue après centrifugation, donne lieu à un sarcome après huit jours.



FIG. 10. — Sarcome après inoculation dans la peau.

EXPÉRIENCE IV. — Agitation pendant quinze minutes, suivie de centrifugation pendant dix minutes. Inoculation du liquide surnageant (1 c. c. 5) à 2 souris sous la peau. Après trois semaines, une souris présente, au niveau de l'inoculation, un sarcome ; l'autre n'a rien. La partie inférieure, adhérente au fond du tube, inoculée à une dose massive à 2 souris, donne lieu, au bout de deux semaines, à une tumeur sarcomateuse chez une souris ; l'autre reste indemne.

EXPÉRIENCE V. — Agitation pendant quinze minutes; centrifugation pendant dix minutes. Décantation de la partie liquide, suivie d'une nouvelle centrifugation pendant quinze minutes.



FIG. 11. — Métastases dans les ganglions chez une souris inoculée dans la peau.

Injection de la partie surnageante à 1 souris; celle-ci meurt au bout de cinquante jours, sans présenter de tumeur.

EXPÉRIENCE VI. — Tumeur (2 grammes) émulsionnée dans 7 cent. cubes d'eau physiologique et agitée pendant vingt-trois minutes. Première centrifugation pendant dix minutes,

suivie de décantation. Deuxième centrifugation pendant dix minutes; décantation. Troisième centrifugation pendant quinze minutes. Le liquide surnageant, absolument clair et ne renfermant pas de cellules visibles au microscopique, est injecté (1 c. c. 5) sous la peau à 3 souris. Au bout de trois à quatre



FIG. 42. — Métastases dans les ganglions chez une souris inoculée dans la peau

semaines, on constate chez toutes les souris des sarcomes au niveau de l'inoculation. Chez l'une d'elles, la tumeur, après avoir atteint le volume d'un haricot, commence à régresser, ce qui n'a jamais été constaté jusque-là. L'examen microscopique montre, à côté du tableau typique de sarcome, de nombreux foyers de nécrose. Chez les deux autres souris, le sarcome a

atteint les dimensions d'une grande noix. (Les souris ont été sacrifiées et la tumeur a été transplantée.)

EXPÉRIENCE VII. — Même opération que précédemment. Sur

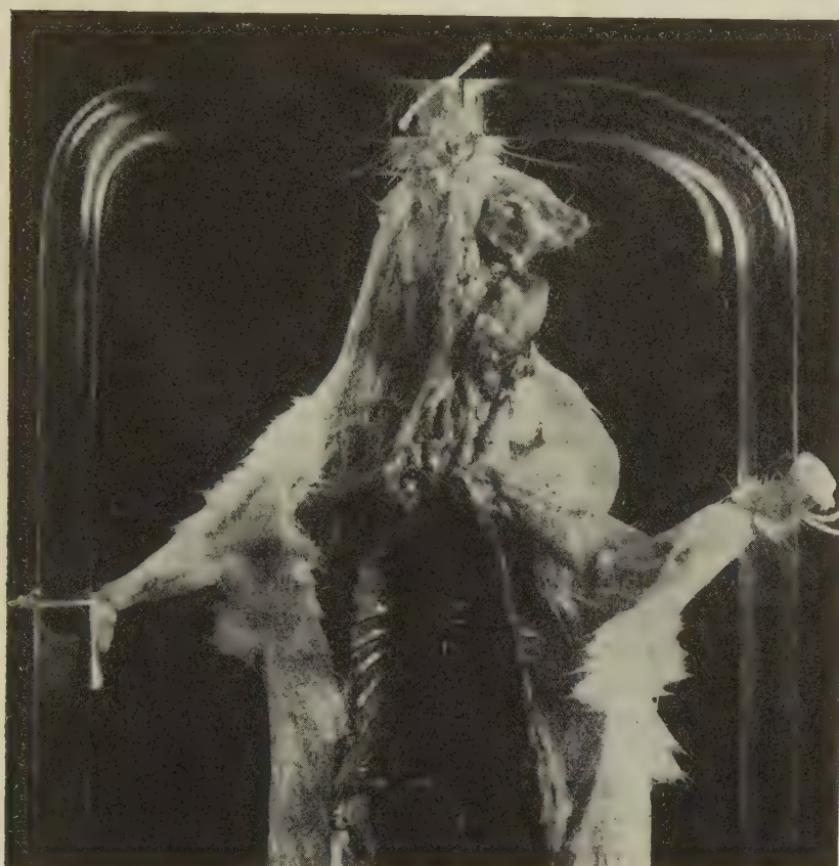


FIG. 43. — Tumeur de la mâchoire
après ingestion d'une émulsion sarcomateuse.

3 souris, 1 est morte d'une infection intercurrente après quatre semaines ; les 2 autres ont survécu, mais sans présenter de tumeurs.

EXPÉRIENCE VIII. — Agitation pendant trente minutes, suivie d'une première centrifugation pendant dix minutes, puis d'une

seconde centrifugation pendant vingt minutes. Injection (1 c. c. 5) du liquide surnageant sans résultat.

EXPÉRIENCE IX. — Agitation pendant quarante minutes. Centrifugation, répétée trois fois, pendant dix, vingt et quinze minutes. Inoculation de la partie supérieure à 7 souris avec résultats négatifs. La partie solide, obtenue après la première centrifugation, est injectée à 6 souris. Chez toutes, on constate le sarcome dans le délai de huit à quinze jours.

VIRULENCE DE LA TUMEUR BROYÉE ET FILTRÉE.

La tumeur, finement broyée, additionnée d'eau physiologique, est filtrée sur papier buvard, puis sur bougie Chamberland L1. De ce filtrat, il est injecté 1 c. c. 5 à 2 souris sous la peau et à 3 souris dans le péritoine. Sur les 2 souris injectées sous la peau, une succombe après trente jours ; l'autre (femelle) présente, après soixante-dix-neuf jours, un adéno-carcinome dans la région axillaire (fig. 5 et 6). Sur 3 souris injectées dans le péritoine, 1 (femelle) présente, après cent treize jours, sur la partie dorsale, au-dessous de l'épaule droite, un adéno-carcinome ; les 2 autres restent indemnes. Plusieurs autres expériences ayant porté sur 50 souris, faites dans des conditions analogues, donnèrent un résultat négatif.

A 19 souris, il a été introduit sous la peau ou dans le péritoine des sacs en collodion renfermant des émulsions de tumeurs. Chez 2 souris, porteuses des sacs péritonéaux, il a été constaté, après vingt-deux et treize jours, des tumeurs autour des sacs : chez l'une d'elles, il y eut des tumeurs multiples dans la cavité péritonéale. Une tumeur a été constatée autour du sac chez une souris à laquelle le sac a été introduit sous la peau vingt-cinq jours auparavant (fig. 7 et 8). Les autres animaux n'ont rien présenté d'anormal.

DE LA VIRULENCE DU SARCOME SUIVANT LA VOIE D'INOCULATION.

Injecté *sous la peau*, le sarcome, finement broyé, donne lieu au niveau de l'inoculation à une tumeur de même structure (fig. 9).

A la suite de l'inoculation *dans la peau*, on voit se former, deux à trois jours après, une petite tuméfaction jaunâtre qui augmente très lentement. Dans la majorité des cas, on assiste à l'apparition des métastases dans les ganglions avoisinants, aux quatre extrémités, et dans les ganglions mésentériques à

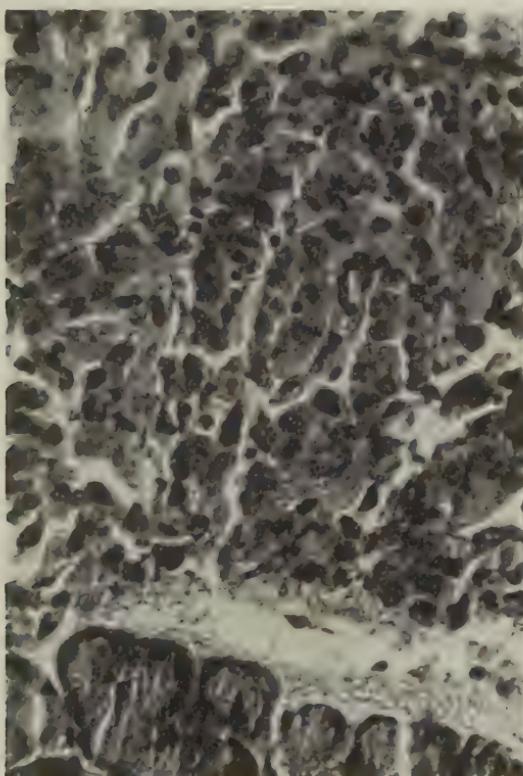


FIG. 14. — Tumeur de la mâchoire après ingestion d'une émulsion sarcomateuse.

la hauteur des reins (fig. 10). Ces métastases sont susceptibles d'atteindre des dimensions telles que chacune d'elles peut dépasser celles de la tumeur primitive (fig. 11 et 12). Fait à noter, à la suite des inoculations dans la peau, un résultat positif peut être obtenu avec des doses de tumeur inférieures à celles nécessaires en cas d'inoculations sous la peau; en d'autres termes, la voie intracutanée est plus réceptive que la voie sous-cutanée.

La friction de la peau rasée avec de la bouillie sarcomateuse



FIG. 15. — Introduction d'une sonde molle par la voie rectale.

est sans effet (10 souris). Dans un cas, nous vîmes apparaître, dix jours après, un granulome gros comme un pois.



FIG. 16. — Sarcome du rectum après inoculation
au moyen d'une sonde molle.

Chez 1 souris, la friction pratiquée sur la face interne d'un lambeau cutané isolé et recousu après donna lieu, au niveau de l'inoculation, à une vraie tumeur sarcomateuse, après une période d'incubation de deux semaines.

La voie *intramusculaire* semble moins réceptive que la voie sous-cutanée.

L'injection *dans le péritoine* provoque, après une période de sept à dix jours d'incubation, des tumeurs multiples dans la



FIG. 17. — Sarcome du rectum après inoculation au moyen d'une sonde molle.

cavité péritonéale, surtout au niveau du mésentère. On constate en même temps une tumeur au niveau de la peau et du péritoine, au point de la pénétration de l'aiguille. Le liquide péritonéal est sanguinolent. Une petite dose (0,01-0,001) de tumeur suffit, en général, pour donner un résultat positif.

A la suite d'une inoculation *intraveineuse*, nous avons observé, dans 1 cas, un sarcome des poumons apparu après treize jours ; dans 2 autres cas, il y eut une tumeur de la queue, au niveau de l'inoculation dans la veine.

L'inoculation *dans la plèvre* donne lieu à un sarcome qui envahit la cavité et la paroi thoraciques.

Chez 2 souris, l'inoculation *dans le cerveau* a donné naissance à une tumeur du cerveau, au niveau du crâne.



FIG. 18. — Sarcome de la portion sigmoïde
après inoculation par la voie rectale.

Les résultats de l'inoculation sont moins constants lorsqu'on

s'adresse à *la voie digestive*. Une expérience préliminaire a montré que le sarcome broyé, laissé *in vitro* en contact pendant vingt à trente minutes avec dix fois son volume de contenu stomacal, ne perd pas son pouvoir pathogène ; le suc gastrique de souris ne paraît donc pas exercer d'action atténuante en dehors de l'organisme.

A 4 souris, nous avons fait *ingérer*, pendant deux semaines, tous les jours, à l'exclusion de toute autre nourriture, du sar-

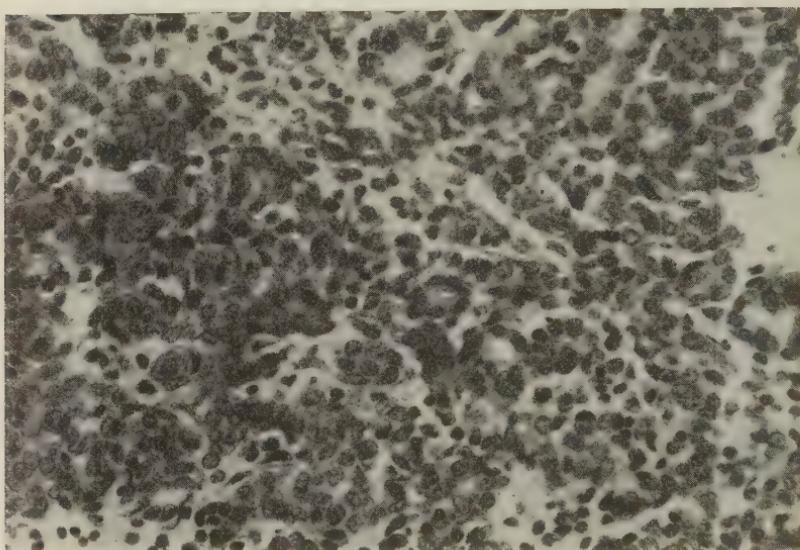


FIG. 19. — Carcinome de la région faciale
après inoculation par la voie rectale.

come émulsionné dans du lait et mélangé à du verre pilé. Après cinq semaines, nous avons vu chez une de ces souris se former, au niveau de la mâchoire gauche, une tumeur sarcomateuse (fig. 13 et 14).

L'inoculation du sarcome par la *voie rectale* était réalisée au moyen d'une sonde molle de Nélaton (N° 9), que nous introduisions dans l'intestin (fig. 15), sur une longueur de 1 cent. 5 à 5 centimètres. On procérait, d'abord, à un lavage de l'intestin à l'eau physiologique (2 à 3 centicubes), puis on laissait l'animal à jeun pendant douze à dix-huit heures. Deux heures

plus tard, on introduisait par le rectum une émulsion épaisse de sarcome (2 à 3 centicubes). Suivant les cas, on laissait l'orifice anal libre (20 souris) ou on l'obturait au moyen du collodion pendant vingt-quatre heures. Dans ce dernier cas (14 souris), pour empêcher le reflux de la masse sarcomateuse, il était inutile de faire pénétrer la sonde profondément.

Sur 20 souris inoculées, sans obturation de l'orifice anal, nous avons observé, dans 2 cas (fig. 16 et 17), un sarcome

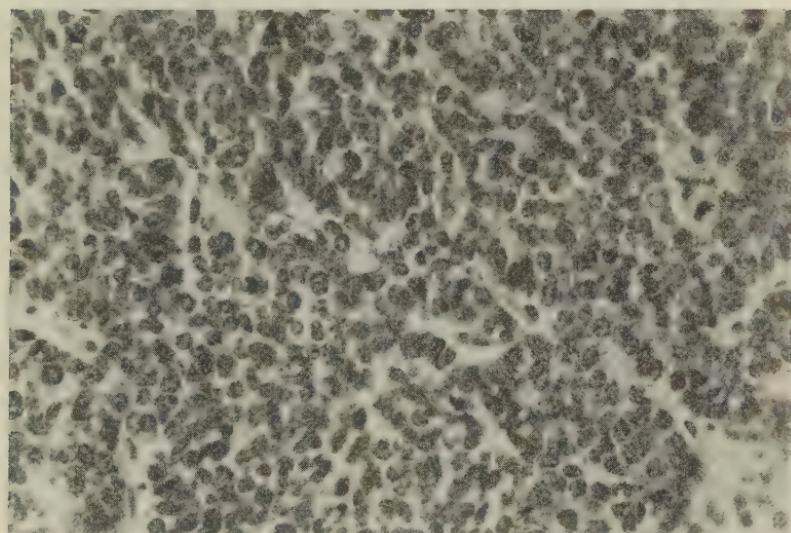


FIG. 20. — Carcinome de la région inguinale
après inoculation par la voie rectale.

typique du rectum au bout de quatre à cinq semaines. Toute l'ampoule rectale, devenue piriforme, était constituée par du tissu néoplasique; ce dernier a envahi la paroi antérieure de la colonne vertébrale jusqu'à la hauteur des reins. Chez plusieurs souris de ce groupe, nous vîmes se former, au bout de vingt-deux à trente-cinq jours, un granulome sténosique, non spécifique, au niveau de la portion sigmoïde.

Sur 14 souris ayant eu l'anus obturé, nous avons constaté, chez 2 souris, après trois à cinq semaines, une sténose de la sigmoïde produite par du tissu sarcomateux (fig. 18). Chez une troisième souris, il y eut une forte sténose de nature granulo-

mateuse ; chez une quatrième souris, seize jours après l'inocu-



Fig. 21. — Sarcome dans le creux inguinal
après inoculation par la voie rectale.

lation, nous avons constaté un sarcome étendu de l'intestin

grèle de 4 centimètres environ, à 12 à 16 centimètres au-dessus



FIG. 22. — Sarcome produit par une émulsion de foie vingt-quatre heures après l'inoculation.

de l'anus. Chez une cinquième souris (femelle), onze jours après l'inoculation, il apparaît dans la région faciale, juste au-

dessous de l'oreille gauche, un carcinome de structure alvéolaire. Vingt-quatre heures après l'extirpation de ce dernier, une tumeur se développa dans la région inguinale; il s'agissait d'un carcinome trabéculaire (fig. 19 et 20) qui fut opéré. Deux à trois semaines après, on vit se former une infiltration néoplasique autour de l'anus et, en même temps, une petite tumeur récidivante au-dessous de l'oreille gauche. Chez une sixième souris (mâle), trois semaines après l'inoculation, il a été

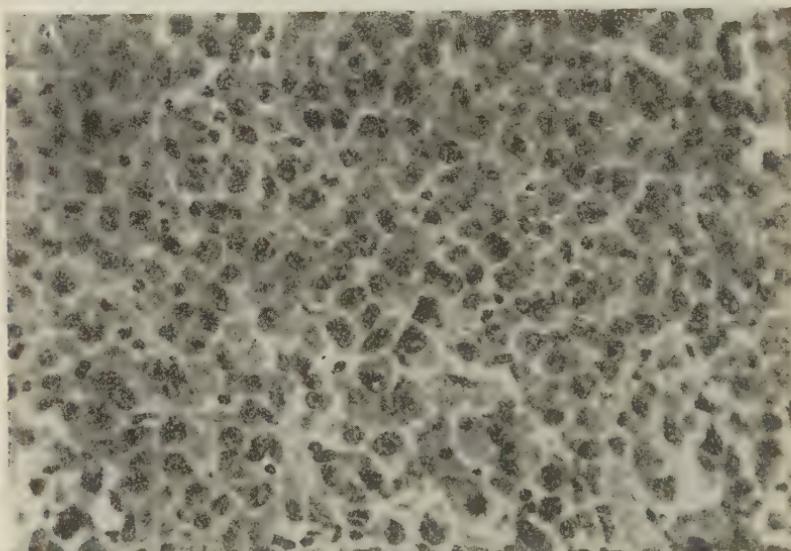


FIG. 23. — Sarcome produit par une émulsion de foie cinq heures après l'inoculation.

constaté un sarcome près de l'anus, dans le creux inguinal gauche (fig. 21). Chez une septième souris, quatre semaines après l'inoculation, il se forma un sarcome au niveau du mésentère, près du rectum.

DE LA VIRULENCE DU SANG ET DES ORGANES DES SOURIS INOCULÉES.

A 3 souris il a été inoculé, sous la peau, du sang du cœur (0 c. c. 2) provenant d'une souris atteinte d'un sarcome gros comme un pois. Deux semaines plus tard, chez une de ces

souris, on constata une tumeur qui augmenta rapidement de volume : l'examen histologique montra qu'il s'agissait d'un sarcome ; les deux autres souris restèrent indemnes. Dans une autre expérience, il a été injecté à 2 souris 0 c. c. 25 de sang du cœur, provenant d'une souris porteuse de tumeur. L'examen microscopique de ce sang n'a pas permis d'y révéler la moindre trace de cellule suspecte ; huit jours après l'inoculation, on constata un sarcome à évolution rapide. Dans plusieurs

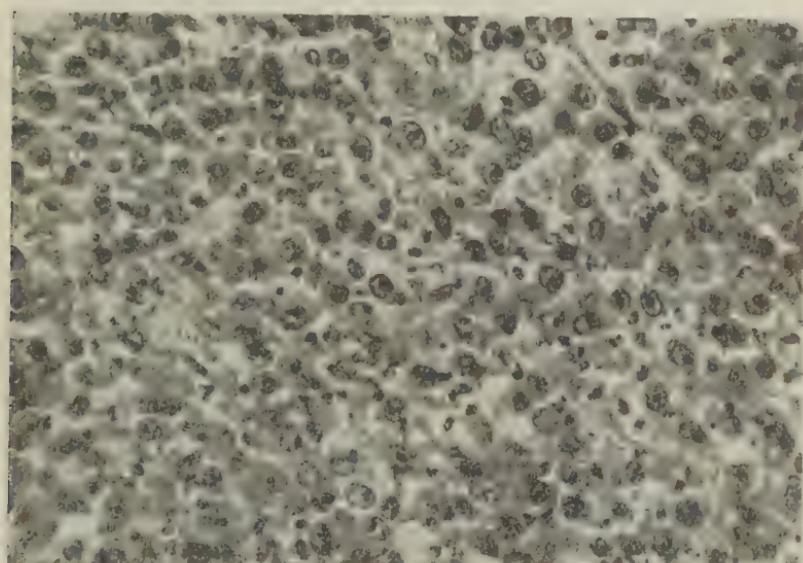


FIG. 24. — Sarcome obtenu chez un rat inoculé avec la tumeur de souris.

cas, des résultats positifs ont été obtenus avec le sang et le foie chez des souris inoculées depuis seulement cinq à vingt-quatre heures (fig. 22 et 23) ; notons toutefois que les expériences faites dans ces conditions ne donnent pas toujours des résultats positifs (11 cas positifs sur 39).

Une de ces expériences mérite d'être relatée. Il s'agissait d'une souris à laquelle il a été injecté, sous la peau, une émulsion de tumeur sarcomateuse. Vingt-quatre heures après, cette souris a été sacrifiée. Le sang du cœur (0 c. c. 3), prélevé pendant la narcose à l'éther, a été inoculé à une souris, le foie a été inoculé à une autre souris, la rate à une troisième et les

reins à une quatrième. Chez les trois premières souris, le résultat fut positif : chez la souris inoculée avec du sang le sarcome apparut après dix-neuf jours; chez la souris inoculée avec le foie, après douze jours; chez la souris inoculée avec la rate, après quarante-trois jours; la souris à laquelle a été injecté le tissu rénal demeura indemne.

Dans une autre expérience faite dans des conditions en apparence semblables, l'inoculation du tissu rénal donna lieu à une tumeur après trente-six jours, tandis que celle du sang demeura négative; les autres organes n'ont pas été injectés. En nous basant sur d'autres expériences de même ordre, nous avons l'impression que c'est le foie qui donne les résultats les plus constants, surtout chez des souris inoculées depuis sept à neuf jours.

MODIFICATIONS DE LA VIRULENCE DU SARCOME PAR DES AGENTS PHYSIQUES.

La tumeur sarcomateuse, triturée et émulsionnée dans de l'eau physiologique, ne conserve pas sa virulence au delà de quarante-huit heures, ni à la température du laboratoire, ni à celle de 4° C; elle ne conserve pas non plus sa virulence dans la glycérine; dans le liquide de Drew, la tumeur n'est plus inoculable après trois jours; la même tumeur, conservée pendant trois jours dans du blanc d'oeuf, a pu donner encore un sarcome; dans du lait, la tumeur garde également son pouvoir pathogène pendant trois jours.

Dans une de nos expériences, la tumeur a été broyée en présence du lait sans addition d'eau physiologique. Après un séjour de vingt-quatre heures à la température du laboratoire, l'émulsion a été centrifugée; la partie supérieure, qui ne paraissait pas renfermer de cellules, a été injectée à 2 souris sous la peau. Ces 2 souris présentèrent, quinze jours plus tard, des sarcomes au niveau de l'inoculation. Dans une autre expérience, un fragment de tumeur sarcomateuse, gros comme un pois, a été conservé pendant trois jours dans du lait; le liquide surnageant, retiré avec précaution et injecté sous la peau d'une souris neuve, donna naissance, quatre semaines plus tard, à un sarcome typique au niveau de l'inoculation.

La dessiccation de la tumeur pendant un à trois jours dans le vide, sur acide sulfurique ou sur potasse caustique, fait disparaître le principe pathogène.



FIG. 25. — Récidive et métastase
à la suite de l'ablation totale de la tumeur.

La tumeur, broyée et émulsionnée dans de l'eau physiologique, cesse d'être virulente après avoir été portée pendant

vingt-quatre heures à 37°, pendant quatre heures à 40°, pendant deux heures à 41°, pendant une heure à 42° ou pendant vingt à trente minutes à 43°.

Les souris, qui sont déjà en puissance d'une tumeur, laissées pendant des semaines à l'étuve à 37°-38°, voient leurs tumeurs évoluer d'une façon normale. L'évolution de la tumeur paraît retardée chez des souris soumises à 41°. Dans une de nos expériences, nous avons soumis à 43°, pendant vingt-quatre heures, 6 souris venant d'être inoculées : 3 souris sont mortes dans la nuit, les 3 autres survécurent sans présenter de tumeur.

MODIFICATIONS DE LA VIRULENCE DU SARCOME
AU COURS DES PASSAGES.

En faisant passer le sarcome à de courts intervalles (sept jours au lieu de quatorze) de souris à souris, on arrive à exalter la virulence de la tumeur : la période d'incubation se trouve raccourcie : la tumeur atteint déjà après cinq à sept jours les dimensions d'un haricot. Après huit à dix passages, la tumeur atteint un haut degré de virulence. A un moment donné, la virulence diminue et la période d'incubation de cinq jours passe tout à coup à douze-quinze jours.

Dans une de nos expériences, le sarcome, après avoir fait plusieurs passages rapides par la souris, fut injecté, à une dose massive (2 cent. cubes), sous la peau d'un rat. Ce dernier présenta, au bout d'une semaine, un sarcome gros comme un œuf de poule (fig. 24). Cette tumeur fut inoculée à 2 autres rats : chez ces derniers, au bout de douze jours, on vit apparaître des tumeurs dans lesquelles l'examen microscopique a révélé la présence des cellules sarcomateuses et des zones nécrotiques ; ces tumeurs régressèrent dans les deux semaines qui ont suivi.

MODIFICATIONS DE LA VIRULENCE A LA SUITE DE LA RÉINJECTION
OU DE L'ABLATION DU SARCOME.

Les souris, qui sont déjà porteuses d'une tumeur, réagissent souvent à la réinoculation autrement que les souris neuves : dans plusieurs cas, la réinoculation d'une dose sûrement mortelle sous la peau ou dans le péritoine demeura sans effet ; dans

d'autres cas, la tumeur primaire manifesta, à la suite d'une réinoéulation, une tendance à se résorber, dans un cas, même complètement, et nous vîmes, chez cette souris, apparaître des métastases qui l'emportèrent en peu de temps. Dans la plupart des cas on assiste, lors de la réinoculation dans la peau ou dans le péritoïne, à la formation simultanée de deux tumeurs dont l'une se développe généralement moins rapidement que l'autre.

Lorsque chez une souris, qui est déjà porteuse d'une tumeur, on procède à l'ablation totale de cette dernière, on voit apparaître, plusieurs jours plus tard, une récidive au niveau de l'opération, puis, assez rapidement, une ou plusieurs métastases au niveau des ganglions lymphatiques avoisinants (fig. 25); nous rappelons que de telles métastases sont rares chez des souris non opérées.

De l'ensemble de ces constatations, il se dégage l'impression que la tumeur, qui est en voie de développement, confère à l'animal un certain degré d'immunité.

CONCLUSIONS.

L'inoculation du sarcome finement trituré est positive par toutes les voies. La souris est particulièrement réceptive aux inoculations par les voies intraperitoneale et intracutanée; dans ce dernier cas, on observe des métastases multiples de fortes dimensions dans les ganglions; de telles métastases sont exceptionnelles à la suite de l'inoculation sous la peau.

L'administration de l'émulsion sarcomateuse par voie buccale est rarement positive (1 cas); la voie rectale se prête plus aisément à la reproduction du sarcome. Dans un cas, un sarcome intestinal fut observé bien au delà de l'extrémité de la sonde.

Le principe pathogène du sarcome ne se trouve pas seulement dans la tumeur; les organes des souris récemment inoculées se montrent virulents dans certains cas; vingt-quatre heures et même cinq heures après l'inoculation, on peut retrouver le principe actif dans le sang.

La partie liquide, obtenue après centrifugation du sarcome broyé et agité, bien que ne montrant pas de cellules au microscope, peut donner naissance à une tumeur.

Le pouvoir pathogène du sarcome ne résiste ni à la température élevée (40° pendant quatre heures), ni à la dessiccation, ni au séjour prolongé (trois jours) à la température du laboratoire.

L'agitation, en présence de billes de verres, de la tumeur broyée, atténue ou inactive complètement selon la durée de l'agitation, le pouvoir pathogène; l'émulsion sarcomateuse, soumise à l'agitation pendant plus de deux heures, n'est plus capable, en général, de donner un résultat positif.

L'ablation de la tumeur met l'animal dans un état d'infériorité se traduisant par l'apparition rapide d'une récidive au niveau de l'opération et par des métastases à distance. Par contre, une deuxième inoculation à la souris, déjà porteuse d'une tumeur, semble être mieux supportée que la première.

En présence des faits qui viennent d'être exposés, ne saurait-on substituer à l'idée de greffe, généralement adoptée à l'heure actuelle, une autre que nous considérons, d'ailleurs, comme une simple hypothèse de travail: la tumeur, de nature plus ou moins maligne, serait une réaction de défense de l'organisme vis-à-vis d'un virus répandu dans la nature, comme l'est le staphylocoque, par exemple, mais beaucoup plus fragile que ce dernier; ce virus se laisserait aisément détruire par des agents physiques et mécaniques; il se développerait comme la plupart des agents infectieux, seulement au niveau des tissus dont l'immunité naturelle est amoindrie.

RECHERCHES SUR L'IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DU NICKEL ET DU COBALT (1)

par MM. GABRIEL BERTRAND et HIROSI NAKAMURA.

Lorsqu'il a été reconnu par l'un de nous en collaboration avec Macheboeuf que les organes de l'homme et des animaux renferment normalement de très petites quantités de nickel et de cobalt (2), la question s'est posée de savoir si ces métaux étaient de simples impuretés de la matière vivante ou bien s'ils remplissaient un rôle physiologique quelconque, comparable, par exemple, à ceux du fer et du zinc.

Des expériences furent alors poussées dans plusieurs directions à la fois. Contrairement à toute attente, celles qui donnèrent les premiers résultats furent celles qui, ayant pour objet de rechercher une fonction physiologique spéciale du nickel et du cobalt, permirent de démontrer l'existence d'une relation entre les deux métaux, le pancréas et l'insuline (3).

Tandis que se développaient ces premières expériences, nous étions occupés à rechercher, par la méthode d'alimentation synthétique, si le nickel et le cobalt intervenaient, au moins d'une manière globale, dans les processus nutritifs et les phénomènes de croissance. Malgré l'extrême petitesse des proportions de nickel et de cobalt, de l'ordre de quelques centièmes de milligramme par kilogramme de matière vivante, avec lesquelles nous avions affaire, nous étions encouragés dans cette voie par les résultats obtenus au cours des années précédentes en appliquant la méthode à l'étude du zinc et du fer (4).

(1) Un extrait de ce mémoire a été publié dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 185, 1927, p. 321.

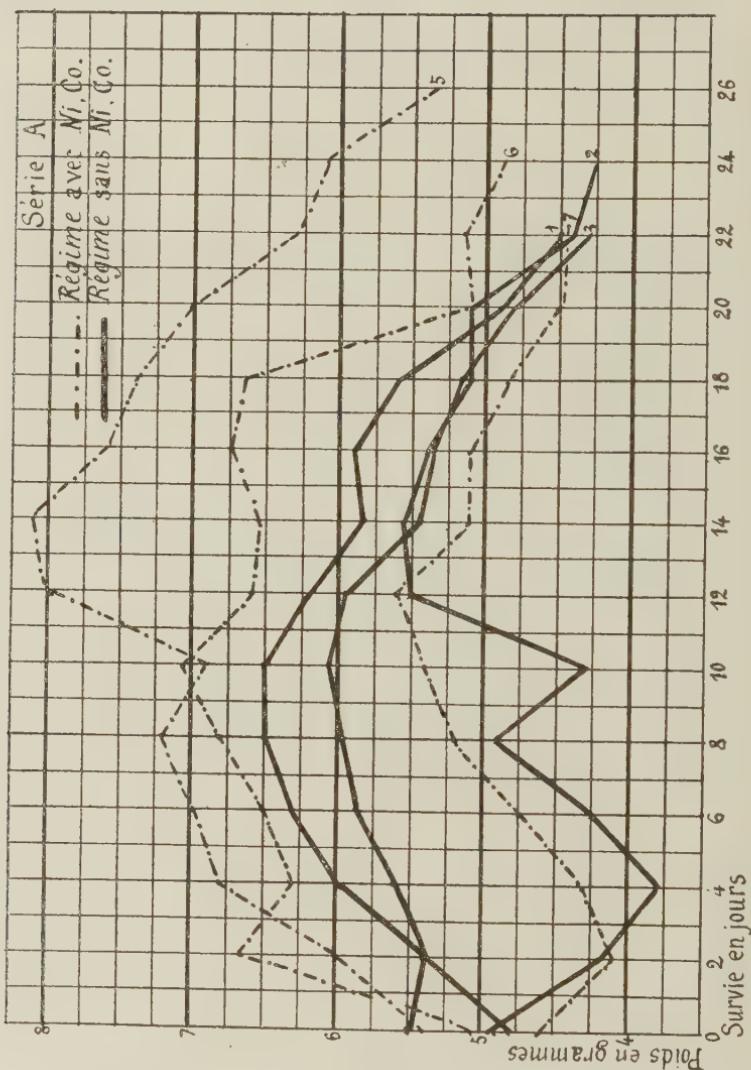
(2) Gab. BERTRAND et MACHEBOEUF. *B. Soc. Chim.* (4), 37, 1925, p. 934, et 39, 1926, p. 942.

(3) Gab. BERTRAND et MACHEBOEUF. *B. Soc. Chim.* (4), 39, 1926, p. 1646, et 41, 1927, p. 1213.

(4) Gab. BERTRAND et B. BENZON. Ces *Annales*, 38, 1924, p. 405 et p. 449, et *B. Soc. chim. biol.*, 6, 1924, p. 203 et 394; Gab. BERTRAND et H. NAKAMURA. Ces *Annales*, 39, 1925, p. 698, et 39, 1925, p. 708; *B. Soc. chim. biol.*, 7, 1925, p. 942

On se rappelle le principe de cette méthode : des souris d'une même portée sont séparées de leur mère à l'âge de trois

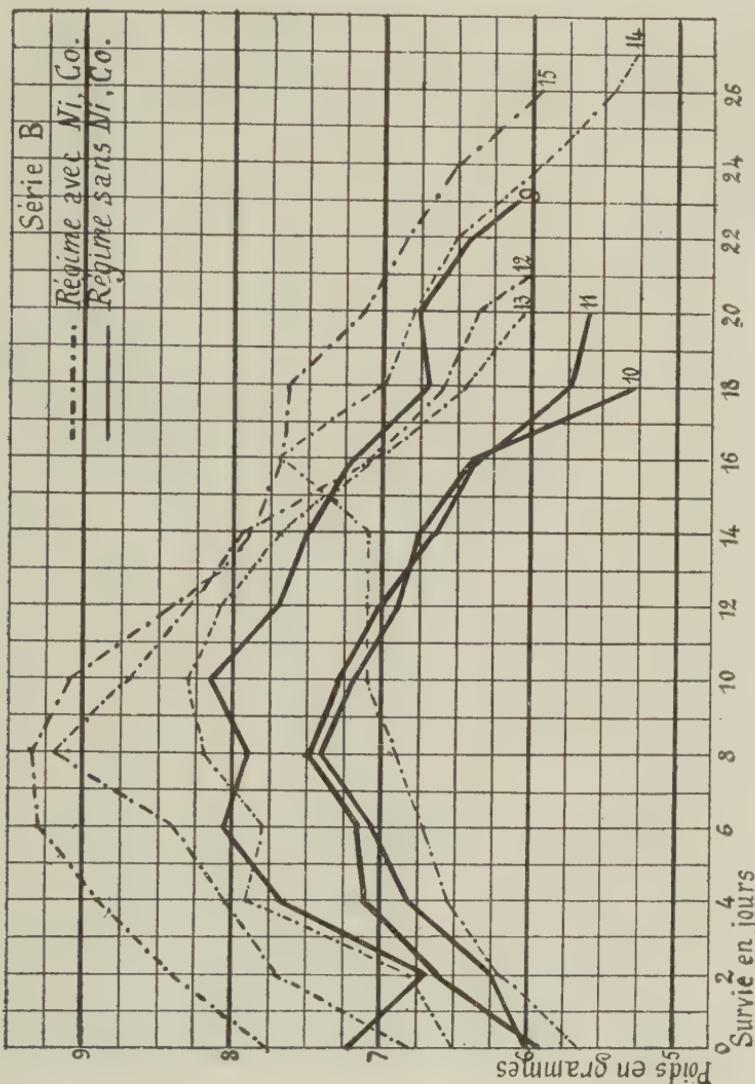
GRAPHIQUE A.



semaines, c'est-à-dire au moment où il est possible de les sevrer, et partagées en deux lots. Celles du premier lot sont nourries avec un mélange de substances organiques et minérales minutieusement purifiées, celles du second avec le même

mélange additionné d'une quantité connue et très petite des métaux en expérience. On note les différences qui peuvent se

GRAPHIQUE B.

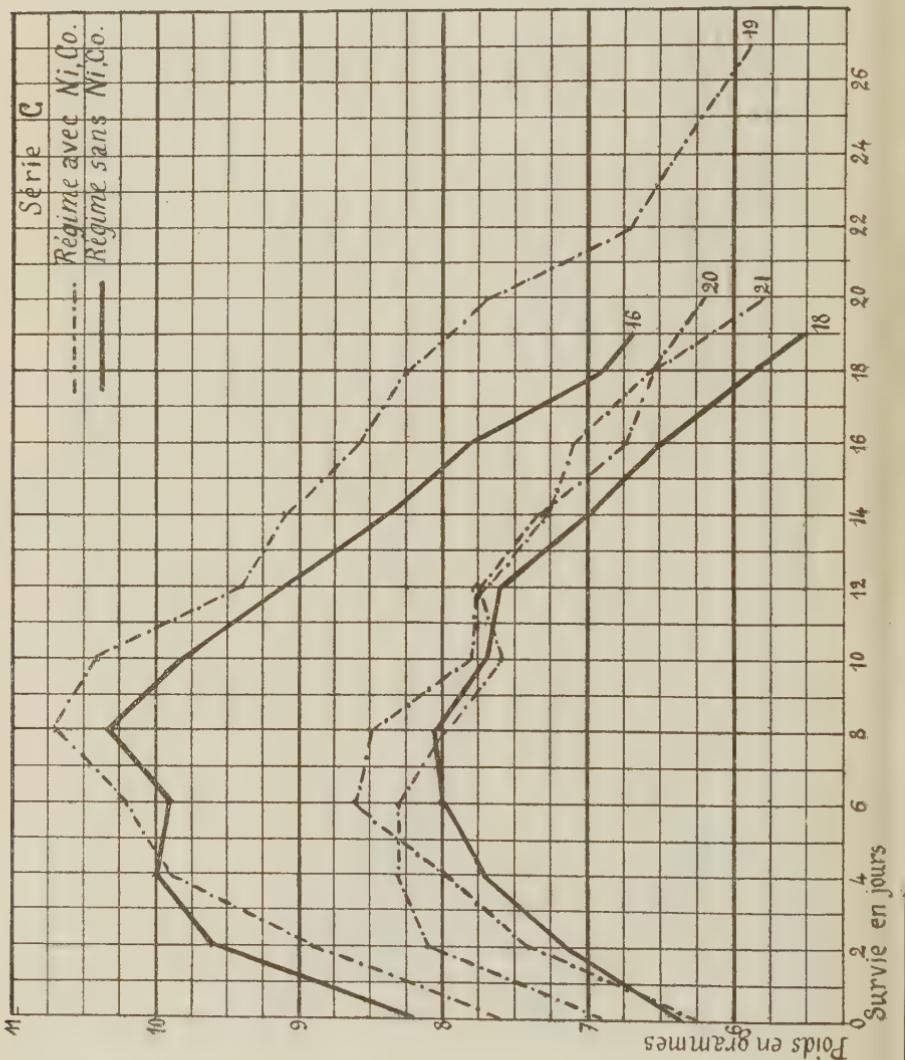


manifester et l'on renouvelle l'expérience un certain nombre de fois, de manière à obtenir de bonnes moyennes.

Les substances organiques (fécule, lactose, caséine, etc.) et minérales (chlorure de sodium, phosphates, etc.) ont été débar-

rassées de toute trace de nickel et de cobalt par les mêmes procédés que ceux utilisés antérieurement pour obtenir ces

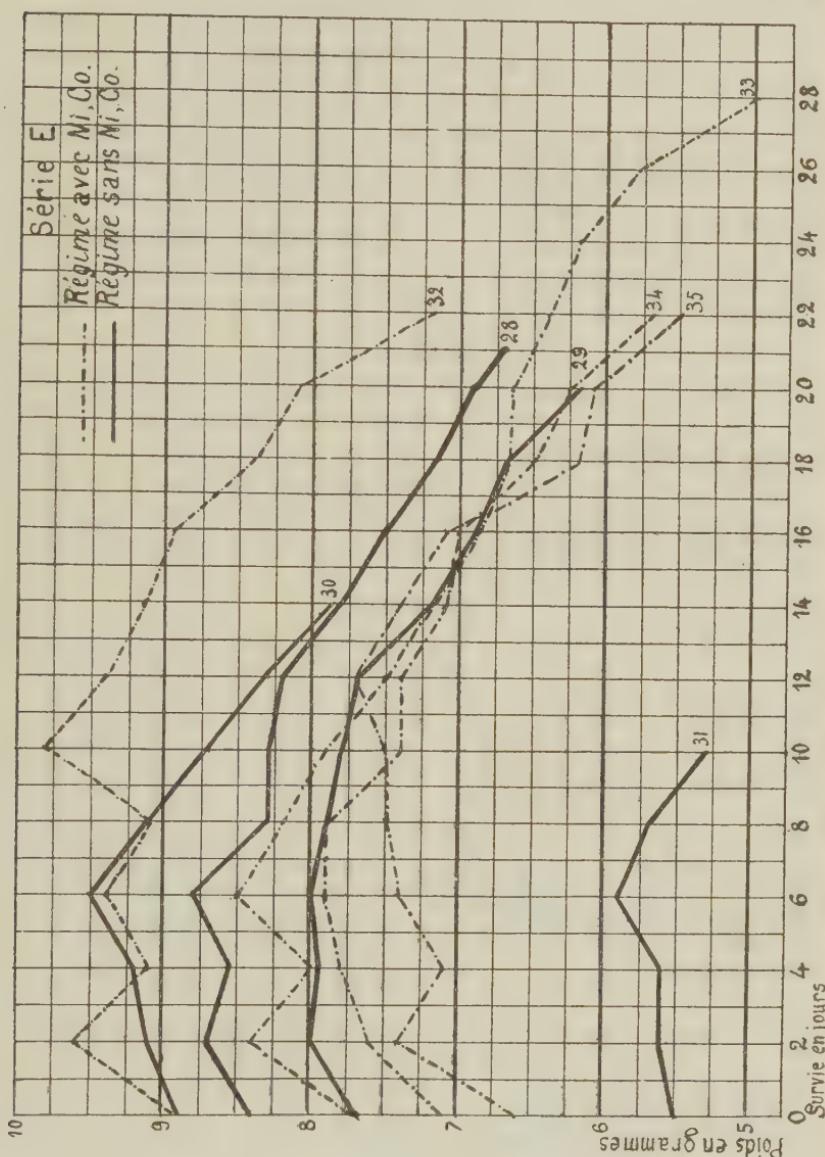
GRAPHIQUE C.



substances exemptes de zinc et de fer; mais, afin d'avoir le maximum de garantie, les purifications ont été multipliées un plus grand nombre de fois encore. C'est ainsi que chaque portion de féculle a été traitée jusqu'à douze fois par l'eau acidulée

d'acide chlorhydrique (1); avec les lavages à l'eau pure, à l'eau

GRAPHIQUE E.



(1) Comme le fer est plus abondant que le nickel et le cobalt dans les produits naturels, qu'il est aussi difficile à éliminer et qu'il présente une réaction de reconnaissance — à l'aide du sulfocyanate d'ammonium — beaucoup plus sensible, nous avons poursuivi la purification jusqu'à ce que la substance traitée ne donnât plus trace de réaction du fer. (Voir Gab. BERTRAND et H. NAKAMURA. Ces *Annales*, 39, 1925, p. 698, et *B. Soc. chim. biol.*, 7, 1925, p. 933.)

	POIDS DES SOURIS en grammes		ALIMENT consommé en grammes	SURVIE en jours
	Au début	A la mort		

SÉRIE A. — Débutant le 9 août 1926 avec des souris blanches nées le 19 juillet 1926 (âgées de vingt et un jours).

Sans nickel	N° 1 (femelle) . .	5,50	4,50	22,2	22
ni cobalt.	N° 2 (femelle) . .	4,95	4,25	22,3	24
	N° 3 (mâle) . .	4,80	4,30	18,9	22
Avec nickel	N° 5 (mâle) . .	5,40	5,35	29,7	26
et cobalt.	N° 6 (mâle) . .	5,05	4,90	26,1	24
	N° 7 (femelle) . .	4,60	3,95	15,9	22

(Graphique A.)

SÉRIE B. — Débutant le 15 juillet 1926 avec des souris blanches nées le 24 juin 1926 (âgées de vingt et un jours).

Sans nickel	N° 9 (mâle) . .	7,20	6,10	27,5	23
ni cobalt.	N° 10 (femelle) . .	6,00	5,30	24,3	18
	N° 11 (mâle) . .	5,90	5,60	23,4	20
Avec nickel	N° 12 (femelle) . .	6,80	6,00	26,5	21
et cobalt.	N° 13 (femelle) . .	6,50	6,05	25,0	20
	N° 14 (femelle) . .	5,65	5,30	28,2	27
	N° 15 (mâle) . .	7,75	5,95	28,3	26

(Graphique B.)

SÉRIE C. — Débutant le 9 août 1926 avec des souris blanches nées le 19 juillet 1926 (âgées de vingt et un jours).

Sans nickel	N° 16 (mâle) . .	8,20	6,70	32,5	19
ni cobalt.	N° 18 (femelle) . .	6,35	5,50	27,8	19
Avec nickel	N° 19 (femelle) . .	7,60	5,90	40,6	27
et cobalt.	N° 20 (femelle) . .	6,90	6,20	26,6	20
	N° 21 (mâle) . .	6,25	5,80	32,9	20

(Graphique C.)

SÉRIE D. — Débutant le 9 août 1926 avec des souris blanches nées le 19 juillet 1926 (âgées de vingt et un jours).

Sans nickel	N° 22 (mâle) . .	7,65	6,90	30,2	24
ni cobalt.	N° 24 (femelle) . .	6,95	5,60	24,4	20
Avec nickel	N° 25 (femelle) . .	7,20	5,90	30,5	20

SÉRIE E. — Débutant le 11 décembre 1926 avec des souris blanches nées le 20 novembre 1926 (âgées de vingt et un jours).

Sans nickel	N° 28 (mâle) . .	8,40	6,70	32,8	21
ni cobalt.	N° 29 (femelle) . .	7,70	6,20	26,0	20
	N° 30 (mâle) . .	8,90	7,80	28,9	14
	N° 31 (mâle) . .	5,50	5,30	13,2	10
Avec nickel	N° 32 (femelle) . .	8,40	7,20	40,6	22
et cobalt.	N° 33 (mâle) . .	7,70	5,00	37,7	28
	N° 34 (mâle) . .	7,10	5,70	27,9	22
	N° 35 (femelle) . .	6,60	5,50	28,6	22

(Graphique E.)

ammoniacale, de nouveau à l'eau pure et enfin à l'alcool, cela représente une vingtaine environ de traitements successifs, comprenant chacun plusieurs heures d'agitation à la machine en présence du liquide choisi, une journée au moins de repos et une décantation. Comme on peut s'en rendre compte, il nous a fallu non seulement beaucoup de soin, mais beaucoup de temps pour préparer le stock de substances nécessaires à l'alimentation de nos animaux.

Nos expériences ont porté sur 35 souris provenant de cinq portées. 6 souris sont mortes d'inanition, par défaut d'accoutumance au régime artificiel auquel nous les soumettions. Il en est donc resté 29, divisées en autant de séries qu'il y en avait de portées.

La formule du mélange alimentaire, façonné en petit pains cuits au four, est restée la même que dans les expériences antérieures, à cela près qu'elle comportait toujours du zinc et du fer. On lui a seulement ajouté, pour les souris du second lot, 0 gr. 0025 de chlorure de nickel et 0 gr. 001 de sulfate de cobalt par kilogramme (1). (Voir à la page 376 le tableau des résultats obtenus.)

En résumé, nous avons eu 14 souris alimentées sans nickel ni cobalt dont la survie moyenne a été dix-neuf jours sept dixièmes, et 15 souris ayant reçu du nickel et du cobalt dont la survie moyenne a été de vingt-trois jours un dixième.

Nous avons constaté, en outre, que les souris nourries avec le mélange nutritif additionné de nickel et de cobalt avaient fixé une partie de ces métaux dans leurs tissus. Les ayant vidées de leur tube digestif et analysées, nous avons trouvé, en moyenne :

CHEZ LES SOURIS ALIMENTÉES	NICKEL PAR		COBALT PAR	
	souris	kg.-sec.	souris	kg.-sec.
Sans nickel ni cobalt : : : :	milligr.	milligr.	milligr.	milligr.
Avec nickel et cobalt : : : :	0,0004	0,047	0,00035	0,025
	0,0027	0,198	0,00085	0,065

(1) En se basant sur des analyses d'aliments végétaux et notamment de céréales [Gab. BERTRAND et MOKRAGNATZ. *Bull. Soc. chim.* (4), 37, 1925, p. 554].

Ces résultats démontrent, d'une manière directe, l'intervention du nickel et du cobalt dans l'ensemble des phénomènes nutritifs. On ne remarquera pas sans intérêt qu'il a suffi de quelques centièmes de milligramme de ces deux métaux ajoutés aux aliments pour augmenter la survie des animaux en expérience de 17 p. 100 environ; encore faut-il noter qu'une partie seulement (à peu près un dixième) avait été retenue par l'organisme.

RECHERCHES SUR CERTAINES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DES SÉRUMS SANGUINS

par MAURICE DOLADILHE.

(*Institut régional d'Hygiène, Dijon.*)

I. — INFLUENCES EXERCÉES PAR UN SÉRUM SANGUIN SUR LES GRANULES D'UN HYDROSOL COLLOÏDAL.

a) Les phénomènes qui suivent l'addition d'un sérum sanguin à un hydrosol colloïdal dépendent, toutes autres choses égales, de la concentration sous laquelle le sérum se trouve dans le mélange. Si, par exemple, on considère une série de mélanges d'égal volume, constitués par un sérum sanguin et un hydrosol colloïdal dans lesquels l'hydrosol est sous une concentration déterminée et le sérum sous des concentrations croissantes, il existe toujours une série de mélanges contigus qui présentent le phénomène de flocculation. En d'autres termes, l'addition de quantités croissantes d'un sérum sanguin à un hydrosol colloïdal donne toujours lieu à une zone de flocculation précédée et suivie d'une zone de non-flocculation. Pour un mélange de volume donné et un hydrosol déterminé, cette zone de flocculation a lieu entre deux limites a et b ($a < b$) de la concentration du sérum. Les valeurs de a et b dépendent en particulier, ainsi que l'a montré Vernes, de la concentration de l'hydrosol et de la grosseur de ses granules.

On peut se demander quelle influence exerce le sérum sur les granules de l'hydrosol lorsque sa concentration dans le mélange détermine l'une des deux zones de non-flocculation.

Lorsque sa concentration est inférieure à la limite a , c'est-à-dire trop faible pour provoquer la flocculation, on constate que les granules de l'hydrosol sont devenus plus sensibles à l'action flocculante des électrolytes et ont subi par conséquent de la part du sérum une sorte de sensibilisation.

Lorsque, au contraire, sa concentration est supérieure à la limite b , c'est-à-dire trop élevée pour provoquer la flocculation, on observe que les granules sont devenus moins sensibles à l'action flocculante des électrolytes et ont subi par conséquent une protection.

b) Le degré de dispersion de certains hydrosols colloïdaux est fonction du coefficient pH de l'eau de suspension. Ce sont en général des colloïdes à granules électro-négatifs obtenus à partir de leurs solutions alcooliques, tels que les gommes, les résines, ainsi que tous les extraits d'organes utilisés dans les séro-réactions de la syphilis.

Cette influence dispersante exercée par les ions hydrogène est d'autant plus intense que leur concentration est plus faible, c'est-à-dire qu'est plus élevé le coefficient pH de l'hydrosol. Toutes autres choses égales (vitesse de dilution, concentration du colloïde, température de formation, degré de salinité de l'eau), cette dispersion se traduit, optiquement, par une diminution de l'opacité de l'hydrosol, une décroissance de la lumière qu'il diffuse (à 90° par exemple), et par une augmentation notable du taux de polarisation de cette dernière. De même, à mesure que croît son coefficient pH , l'hydrosol dialyse plus facilement (contre de l'eau de même pH). Ces modifications ne présentent une grande netteté que pour des pH très élevés (voisins de 10 en général).

c) Lorsqu'un sérum sanguin est ajouté à un de ces hydrosols, sous une concentration suffisante pour qu'il exerce sur ses granules une action protectrice, nous avons été amené à remarquer et à étudier un phénomène qui s'est révélé particulièrement intéressant.

Le mélange sérum colloïde, opaque au début par suite de la présence du colloïde, s'éclaireit peu à peu. En même temps diminue la quantité de lumière qu'il diffuse et augmente le taux de polarisation de cette dernière. Tout se passe comme si les granules du colloïde se dispersaient peu à peu au sein du sérum. Le coefficient pH ne semble pas être le facteur principal qui conditionne ce phénomène, car on l'obtient pour des concentrations en ions H , bien supérieures à celles pour lesquelles l'hydrosol seul présente ces modifications. Ainsi, un mélange convenable de sérum et de benjoin colloïdal devient au

bout de trente minutes aussi transparent que de l'eau et révèle un coefficient pH voisin de 7, alors que le même hydrosol pris seul sous la même concentration ne présente cet aspect que pour un pH supérieur à 10.

Il peut sembler prématurné de conclure des faits précédents que les granules du colloïde se dispersent au sein du sérum et d'attribuer ainsi à ce dernier un pouvoir disperseur. On pourrait supposer que les protéines sériques, pénétrant et englobant les granules, provoquent une diminution progressive de la différence entre leur indice de réfraction et celui du milieu inter-granulaire, provoquant aussi, d'après la loi de lord Rayleigh, une diminution de l'opacité.

Ce qui nous a amené à fixer notre attention sur la première hypothèse est le fait que le sérum sanguin manifeste nettement dans certains cas un pouvoir de dispersion.

Il suffit, en effet, d'ajouter une quantité suffisante d'un sérum à un hydrosol colloïdal en voie de flocculation (par addition préalable d'un électrolyte, par exemple) pour constater une dispersion graduelle du flocculat.

C'est ce phénomène de dispersion d'un agrégat granulaire que Dujarric de La Rivière, E. Roux et Kossovitch utilisent au cours de leur séro-réaction à la gomme gutte. Ils constatent, en effet, que dans des conditions déterminées de concentration un sérum normal fait rétrograder la flocculation d'un hydrosol de gomme gutte. C'est aussi le cas de la séro-réaction de Vernes au sérum de porc et de celle de Meinicke.

La dispersion d'un flocculat s'accompagne des mêmes modifications optiques que celles signalées précédemment (diminution de l'opacité, de la lumière diffusée, et augmentation du taux de polarisation de cette dernière). Dans le cas particulier où l'hydrosol en voie de flocculation est constitué par un colloïde de la catégorie citée au début de ce paragraphe, il semble que la dispersion du flocculat soit suivie sans aucune discontinuité de la dispersion des granules eux-mêmes.

Ainsi l'addition d'une quantité suffisante de sérum à un de ces hydrosols en voie de flocculation, dont l'opacité augmente à mesure que se poursuit l'agglomération granulaire, provoque l'éclaircissement progressif du mélange. L'opacité h diminue peu à peu, atteint la valeur h_0 que présentait le colloïde addi-

ditionné du sérum au début de la flocculation, puis continue à décroître pour atteindre au bout d'un certain temps une valeur limite h_1 , toujours inférieure à h_0 .

Ainsi, tout se passe comme si l'action dispersante exercée par le sérum sur le flocculat, totale, vis-à-vis de ce dernier, lorsque le mélange est revenu à l'opacité h_0 , continuait de s'exercer sur l'hydrosol stabilisé.

II. — GRAPHIQUE DE FLOCCULATION.

Au cours de la flocculation les granules d'un hydrosol s'aggrèment peu à peu, puis se sédimentent. On peut suivre l'évolution de ce phénomène, ainsi que l'a montré Bouteiric, en procédant à intervalles de temps déterminés, à la mesure de l'opacité du sol. Toutes autres choses égales, cette opacité augmente, d'abord très vite, puis de moins en moins vite, pour atteindre finalement une valeur limite après quoi se produit la sédimentation granulaire. Pour une concentration déterminée de l'hydrosol et un volume donné du mélange colloïde et un agent flocculant pris sous une concentration connue, la valeur limite de l'opacité et l'inverse du temps mis par l'hydrosol pour l'atteindre caractérisent respectivement la grosseur des agrégats granulaires et la vitesse du phénomène de flocculation.

Il est commode, lorsqu'on veut étudier l'évolution de mélanges d'égal volume d'un hydrosol colloïdal pris par exemple sous la même concentration et de quantités croissantes d'un agent flocculant, de mesurer pour chaque échantillon l'opacité limite. On peut ainsi tracer un graphique (que nous nommerons : *graphique de flocculation*) qui, portant, en ordonnée, les opacités limites et, en abscisse, les quantités ou les concentrations correspondantes de l'agent flocculant, permet de représenter d'une façon tangible l'évolution du phénomène.

C'est ce que montre le graphique I relatif à un mélange de gomme gutte colloïdale additionnée de quantités croissantes d'un sérum humain (1).

La partie OA de la courbe est relative à la zone de non-flocu-

(1) Au cours de ce travail, toutes les opacités ont été mesurées au moyen du photomètre Vernes Bricq et Yvon (écran wratten α) et évaluées en densité optique.

lation au cours de laquelle les granules de l'hydrosol subissent de la part du sérum une influence sensibilisante.

La partie ABC représente la zone de flocculation. Le long de AB l'opacité limite augmente rapidement à mesure que croît la quantité du sérum additionné; le point B représente l'optimum de la flocculation, et BC la deuxième partie de la zone de flocculation au cours de laquelle l'opacité limite diminue à mesure que croît la quantité du sérum, mais reste *toujours supérieure* à la somme des opacités propres de l'hydrosol et du sérum.

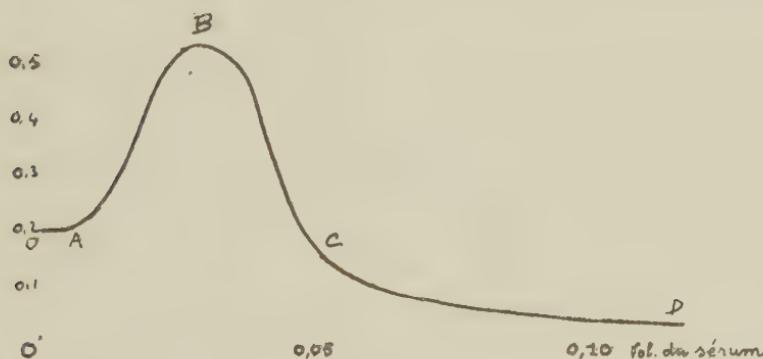


FIG. 1. — Graphique de flocculation d'un mélange de gomme gutte et de sérum humain. Concentration de la gomme gutte, 0 gr. 8 p. 1.000; volume total du mélange, 4 cent. cubes.

Enfin la branche CD, le long de laquelle l'opacité limite, *toujours inférieure* à la somme des opacités de l'hydrosol et du sérum, diminue à mesure que croît la quantité du sérum, représente la zone de dispersion signalée au paragraphe I.

III. — FACTEURS CONDITIONNANT LES PROPRIÉTÉS FLOCULANTES ET DISPERSANTES D'UN SÉRUM SANGUIN.

Les phénomènes qui suivent l'addition d'un sérum sanguin à un hydrosol colloïdal dépendent d'autres facteurs que de la nature et de la concentration de l'hydrosol.

Parmi les principaux nous citerons : la salinité du milieu, la température à laquelle il est porté et les traitements thermiques subis antérieurement par le sérum.

L'influence exercée par ces facteurs est suffisamment importante pour modifier profondément l'allure du graphique de flocculation d'un mélange déterminé.

SALINITÉ DU MILIEU. — L'action d'un sérum sur les granules d'un colloïde est, toutes autres choses égales, considérablement modifiée, suivant qu'elle s'exerce en présence ou en l'absence de sels.

Nous ne procéderons pas, ici, à l'étude complète de cette influence (elle dépend à la fois de la nature du sel et de sa concentration) qui fera l'objet d'une autre publication. Nous nous limiterons au rôle joué par les chlorures monovalents en prenant, comme exemple, le chlorure de sodium.

Toutes autres choses égales, l'addition de NaCl au mélange d'un sérum et d'un colloïde diminue le pouvoir flocculant du sérum et augmente son action dispersante.

Dans chaque cas cette influence croît à mesure qu'augmente la concentration du NaCl.

Il existe donc une différence entre les phénomènes présentés par deux mélanges identiques d'un même hydrosol et d'un sérum sanguin lorsque l'un des deux est en milieu isotonique et l'autre privé de sel. C'est ce que montre, en exemple, le graphique II.

Ainsi l'action dispersante d'un sérum sanguin est considérablement augmentée, alors que son pouvoir flocculant est diminué lorsque le milieu au sein duquel s'exercent ces propriétés est isotonique.

CHAUFFAGE PRÉALABLE DU SÉRUM (1). — Il est curieux de constater que le sérum chauffé est toujours moins flocculant et plus dispersant, vis-à-vis d'un hydrosol déterminé, que lorsqu'il n'a pas été chauffé. Cette double influence est d'autant plus prononcée qu'a été plus intense le traitement thermique subi par le sérum. Or, au cours du chauffage, les deux facteurs temps et température interviennent simultanément; nous sommes donc amené à étudier l'influence exercée par la durée de chauffe

(1) Toutes les expériences effectuées avec des sérums chauffés l'ont été dans des milieux privés de sels.

à une température fixe et par la température pour une durée de chauffe déterminée.

Toutes autres choses égales, l'accroissement et la diminution des actions dispersantes et flocculantes exercées par un sérum sanguin sur les granules d'un hydrosol augmentent à mesure que croît, pour une durée de chauffe déterminée, la température à laquelle a été porté le sérum, passent par des valeurs maxima et diminuent ensuite très rapidement à partir du moment où ce traitement thermique a été suffisamment

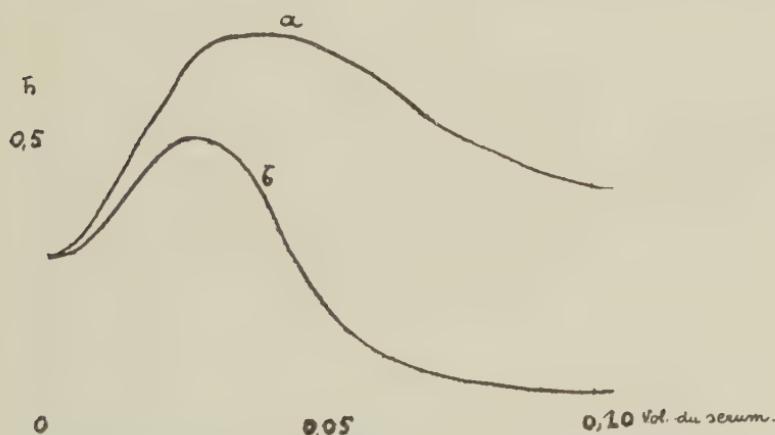


Fig. 2. — Graphique de flocculation de mélanges de sérum humain et de colophane colloïdale (0 gr. 5 p. 1.000) : a) en milieu privé de sel; b) en milieu isotonique.

poussé pour provoquer la destruction de l'équilibre des protéines sériques.

Pour une température déterminée à laquelle est préalablement porté le sérum sanguin, la diminution de son action flocculante et l'accroissement de son pouvoir dispersant augmentent à mesure que croît la durée de chauffe. Elles ne diminuent qu'à partir du moment où cette durée est suffisante (à la température à laquelle est porté le sérum) pour provoquer le déséquilibre de l'édifice protéique.

Ainsi les facteurs temps et température agissent dans le même sens, en sorte que, par exemple, un sérum chauffé à 57° pendant dix minutes se comporte très sensiblement

comme un sérum chauffé à 52° pendant soixante minutes.

Au cours de nos expériences, nous n'avons jamais été amené à remarquer que le point de 55° présente à ce point de vue une *particularité quelconque*. Ainsi pour une durée de chauffe déterminée (suffisamment prolongée naturellement pour que les modifications provoquées soient suffisamment sensibles à des températures très inférieures à 55°) l'augmentation de l'action dispersante d'un sérum vis-à-vis d'un hydrosol déterminé croît régulièrement, toutes autres choses égales à mesure qu'augmente la température.

C'est ce que montre en exemple le graphique III qui donne,

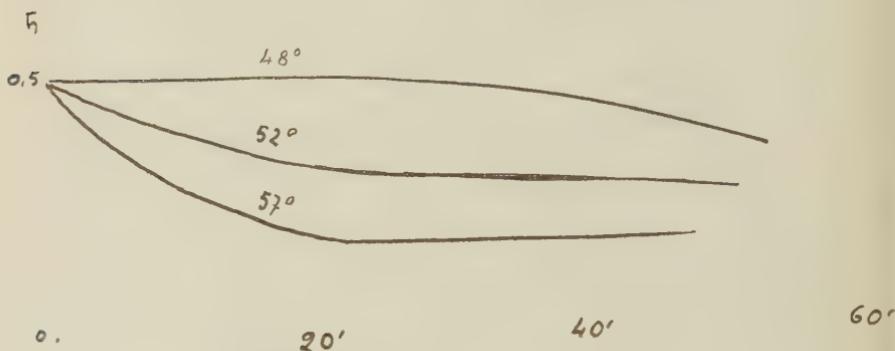


FIG. 3. — Opacités limites d'un mélange de colophane (0 gr. 5 p. 1.000) et de sérum humain (0 c. c. 1) (volume du mélange 3 cent. cubes) lorsque le sérum a été préalablement porté pendant des durées différentes à des températures croissantes.

pour un mélange déterminé de sérum de bœuf et d'un hydrosol de colophane, des valeurs de l'opacité limite atteinte par le mélange en fonction de la température à laquelle a été porté préalablement le sérum pour différentes durées de chauffe (l'action dispersante est d'autant plus prononcée qu'est plus faible l'opacité limite).

CHAUFFAGE DU MÉLANGE SÉRUM-COLLOÏDE. — Le chauffage du mélange sérum-colloïde augmente le pouvoir de dispersion du sérum et diminue son pouvoir flocculant. Cette influence augmente à mesure que croît la température à laquelle est porté le mélange, passe par un maximum puis décroît à partir

du moment où ce facteur thermique est suffisant pour provoquer la destruction de l'équilibre protéique.

C'est ce que montrent, en exemple, les chiffres rapportés dans le tableau I qui donnent les opacités limites des mélanges identiques de benjoin colloïdal et d'un même sérum humain, portés à diverses températures.

TABLEAU I.

Concentration du benjoin, en gramme p. 1.000	0,6
Volume du mélange, en centimètres cubes.	5
Volume du sérum pur additionné au benjoin, en centimètre cube	0,10
Températures auxquelles est porté le mélange, en degrés	15 40 50 55 60
Opacités limites	0,40 0,31 0,23 0,16 0,07

INFLUENCE DU *pH*. — La concentration des ions hydrogène du mélange sérum-colloïde exerce aussi une influence sur les actions flocculantes et dispersantes exercées par le sérum.

D'une façon générale, en milieu acide, le sérum est très flocculant et peu ou pas dispersant ; au contraire, en milieu neutre, ou très faiblement alcalin, il est moins flocculant et plus dispersant.

En somme, le pouvoir flocculant d'un sérum diminue, tandis que son action dispersante augmente à mesure que la réaction du milieu tend vers l'alcalinité, c'est-à-dire à mesure que croît son coefficient *pH*.

C'est ce que montrent les chiffres du tableau II qui donnent les opacités limites de mélanges identiques de gomme gutte et de sérum de mouton pour différentes valeurs du *pH* (1).

TABLEAU II.

Concentration de la gomme gutte, en gramme p. 1.000 . . .	0,3
Volume du mélange, en centimètres cubes.	10
Volume du sérum additionné, en centimètre cube	0,20
Valeur du coefficient <i>pH</i>	5,9 6,3 7 7,5 8 8,5
Opacité limite	0,36 0,27 0,24 0,22 0,20 0,18

Nous avons signalé au paragraphe I que le sérum sanguin pouvait exercer une action dispersante sur les granules d'un

(1) Au cours de ce travail, tous les coefficients *pH* ont été évalués par la méthode électrométrique.

hydrosol en état de flocculation. Nous aurions dû ajouter que, si la quantité de sérum additionné au colloïde n'est pas suffisante, l'action exercée est de sens contraire et se traduit par une accélération de la flocculation.

Or ces pouvoirs flocculants ou dispersants sont conditionnés par les mêmes facteurs dont dépendent ces propriétés sérieuses lorsqu'elles s'exercent sur des granules colloïdaux qui ne sont pas en état de flocculation.

En milieu isotonique, et toutes autres choses égales, un même sérum, suivant la concentration sous laquelle il agit, manifeste des pouvoirs accélérants ou dispersants, dirigés contre des granules colloïdaux en voie de flocculation, respectivement moins intenses ou plus prononcés qu'en milieu privé de sels.

Un sérum chauffé favorisera de même avec moins d'intensité une flocculation, ou la dispersera avec plus de force que s'il n'est pas chauffé.

Le mélange d'un hydrosol colloïdal en voie de flocculation et d'un sérum sanguin évoluera moins vite vers le déséquilibre, ou plus vite vers la déflocculation à mesure que sera plus élevée la température à laquelle il est porté, ou que, pour une température donnée, son coefficient *pH* sera plus élevé.

Ces quelques résultats montrent que l'étude des propriétés flocculantes ou dispersantes d'un sérum sanguin doit, pour être correcte, faire intervenir en plus des facteurs : concentration, grosseur des granules, volume total, la *salinité du milieu*, l'*histoire thermique antérieure du sérum*, la *température d'évolution des phénomènes* et le *pH du milieu*.

On comprend pourquoi les séro-réactions de flocculation, qui consistent surtout à comparer les actions flocculantes et non flocculantes de divers sérum, doivent être soumises à des règles de *technique absolument immuables*.

IV. — MÉTHODE DE SÉPARATION DES PRINCIPAUX GROUPES PROTÉIQUES ET LIPOPROTÉIQUES.

On peut se demander si les actions flocculantes et dispersantes exercées par un sérum sanguin sur les granules d'un hydrosol colloïdal sont les propriétés du sérum total ou celles d'un ou de plusieurs de ses constituants.

C'est dans le but de résoudre cette question que nous avons été amené à envisager la séparation des constituants sériques.

Nous n'avons pas cherché à obtenir chaque protéine à l'état pur, mais nous avons tenté de procéder à la séparation des groupes ou complexes protéiques, ou lipoprotéiques, tels qu'ils doivent exister au sein du sérum.

Nous avons utilisé pour cela les différences de stabilité présentées par ces divers groupes dans certaines conditions.

GROUPE DES GLOBULINES. — Nous avons montré dernièrement (1) qu'un groupe de protéines constitué en majeure partie par les globulines totales présente au sein du sérum une zone d'instabilité comprise entre deux limites du coefficient pH . Nous avons signalé en outre que le pH n'est pas le seul facteur du déséquilibre de ce groupe de protéines, mais qu'il est nécessaire qu'en même temps la concentration des électrolytes libres soit inférieure à une certaine valeur.

En somme, ces protéines ne peuvent se séparer de l'édifice protéique qu'à la condition que soit réduite la concentration des électrolytes sériques et que le sérum possède un coefficient pH compris entre certaines limites.

Dans ces conditions, la précipitation des globulines débute pour un coefficient pH légèrement supérieur à 8, augmente d'intensité à mesure que le pH diminue, présente un optimum (précipitation totale) lorsque ce coefficient est voisin de 6, puis décroît pour s'annuler lorsque le pH atteint une valeur voisine de 4,7.

La valeur du pH pour laquelle la précipitation est totale augmente en général à mesure que croît la dilution du sérum, c'est-à-dire qu'est plus forte la diminution de la concentration de ses électrolytes libres.

Il semble donc que si on réussit à enlever la totalité ou la presque totalité des électrolytes libres d'un sérum, l'optimum de précipitation des globulines sera déplacé notablement vers la région neutre ou alcaline des pH .

C'est bien ce que montre, en effet, la dialyse d'un sérum

(1) *C. R. T.*, 1934, mai 1934, page 1884.

Annales de l'Institut Pasteur, t. LIII, n° 4, 1934.

contre de l'eau distillée. Le sérum légèrement dilué par une partie de l'eau qui traverse le septum perd la totalité (ou presque) de ses sels libres à condition que la dialyse soit poussée, et l'eau changée fréquemment (durée quarante-huit à soixante-douze heures en chambre froide) et laisse précipiter toutes ses globulines (additionnées parfois d'une protéine étrangère déjà signalée par Piettre). La fraction non dialysable du sérum possède après l'opération un ρH compris ordinairement entre 7 et 8.

Cette méthode de séparation des globulines, citée maintes fois dans la littérature biologique, et utilisée déjà par de nombreux auteurs, est, au point de vue physique, celle qui risque le moins de dénaturer les protéines.

C'est elle que nous avons finalement adoptée pour séparer d'un sérum sanguin le groupe des globulines.

Nous avons dit plus haut que le précipité résultant de la dialyse n'est pas entièrement constitué par les globulines totales. Il contient, en effet, dans certains cas, un peu d'une protéine phosphorée et cholestérinée, gélatineuse, légèrement colorée, insoluble dans l'eau, soluble très *lentement* et très *imparfaitement* dans l'eau physiologique, mais très *rapidement* dans le NaCl concentré (à 10 p. 100 par exemple).

La présence de cette protéine étrangère aux globulines, dont elle se distingue, non seulement par son aspect tout différent, mais aussi par le rôle qu'elle joue dans les phénomènes que nous étudions, entache la méthode d'une imperfection que nous nous sommes efforcé de corriger.

Nous verrons plus loin que cette lipoprotéine, dont la plus grande partie reste accolée au groupe des albumines, présente, en l'absence d'électrolyte, une zone d'instabilité vis-à-vis des ions hydrogène comprise entre deux limites déterminées du coefficient ρH de la fraction non dialysable du sérum.

Le mécanisme de sa précipitation partielle avec les globulines est facile à comprendre. Si le coefficient ρH de la fraction non dialysable du sérum prend au cours de la dialyse (par passage de l'eau à travers le septum) une valeur située à l'intérieur des limites précédentes, il en résultera une précipitation de cette lipoprotéine.

C'est ce que montre en exemple le tableau III.

TABLEAU III.

Volume du sérum dialysé, en centimètres cubes 20

pH de l'eau de dialyse	pH de la fraction non dialysable	NATURE DU PRÉCIPITÉ
4,9	5,8	Globulines et lipoprotéines.
5,7	6,4	Globulines et lipoprotéines.
6,8	7,2	Globulines, traces de lipoprotéines.
7,5	7,9	Globulines seules.
8	8,2	Globulines seules.

Ainsi la nature des protéines précipitées dépend essentiellement du coefficient $p\text{H}$ auquel est portée la fraction non dialysable du sérum et par conséquent du $p\text{H}$ de l'eau de dialyse.

Pour que cette opération conduise à la séparation du *seul groupe des globulines totales* sans que soit déséquilibrée la fraction non dialysable du sérum, il est nécessaire que son coefficient $p\text{H}$ ne descende pas au-dessous d'une certaine valeur (voisine d'ailleurs de 7,5). Il suffit dans la plupart des cas, ainsi que nous nous en sommes assuré, d'utiliser pour la dialyse de l'eau distillée dont le coefficient $p\text{H}$ soit compris entre 7 et 7,5.

Ces conditions dans lesquelles doit être effectuée la dialyse d'un sérum sanguin en vue d'obtenir la séparation du seul groupe des globulines n'ont jamais été, à notre connaissance, signalées.

GROUPE DES ALBUMINES. — La partie surnageante du sérum est constituée par le sérum total privé de ses sels et de ses globulines.

Elle contient en particulier la sérine, et, au cours des expériences effectuées en vue de la séparation des deux chaînons de l'alexine, elle a été souvent assimilée à cette protéine.

Elle est en réalité plus complexe comme l'ont montré Piettre et Macheboeuf.

Quelques propriétés de cette fraction du sérum sont très différentes, ainsi que nous le verrons, suivant la présence ou l'absence d'électrolytes.

Telle qu'elle se présente au sortir d'une dialyse poussée, elle est incoagulable par la chaleur et présente une zone d'instabi-

lité vis-à-vis des ions hydrogène que nous utilisons pour effectuer la séparation du groupe lipoprotéique.

On constate en effet par acidification progressive (addition de faibles quantités de solutions acides concentrées) que cette partie du sérum présente (en l'absence d'électrolytes) une zone de précipitation qui débute pour un *pH* voisin de 7,3 et se termine pour un *pH* voisin de 5. L'intensité de ce déséquilibre augmente à mesure que le *pH* diminue à partir de 7,3, passe par un optimum et décroît ensuite.

Le précipité obtenu est ordinairement opaque et très légèrement coloré (brunâtre pour le bœuf par exemple).

Repris par le NaCl physiologique, on assiste à la dissolution rapide d'une protéine blanche (elle-même soluble dans l'eau distillée et très semblable à la sérine) et il reste au fond du tube un produit gélatineux (contenant du phosphore et de la cholestérol) transparent légèrement teinté, lentement et imparfaitement soluble dans le NaCl physiologique et rapidement dans le NaCl concentré (à 10 p. 100 par exemple).

Cette lipoprotéine, qui, dans les conditions signalées précédemment, se retrouve mêlée en partie aux globulines totales, est très analogue au complexe séparé par Macheboeuf, et, traitée par l'éther et l'acétone, qui dissolvent les lipides et les éthers de cholestérol, elle laisse déposer une substance semblable à la myxoprotéine de Piettre.

Ainsi la dialyse d'un sérum sanguin contre de l'eau distillée effectuée dans les conditions précitées permet de séparer le sérum en deux groupes protéiques : *a*) celui des globulines totales, *b*) celui des albumines contenant, outre la sérine, une lipoprotéine phosphorée et cholestérolée séparable elle-même, en l'absence d'électrolyte, par l'action des ions hydrogène.

Dans la suite du présent travail nous étudierons seulement les propriétés manifestées par ces deux groupes, c'est-à-dire par celui des *globulines totales* et celui des *albumines*, vis-à-vis des granules colloïdaux.

Nous nous réservons d'envisager, au cours d'une autre publication, les rôles respectifs joués, dans ces conditions, par chacun des composants de ces groupes.

V. — PROPRIÉTÉS FLOCULANTES ET DISPERSANTES DE CHACUN DES GROUPES PROTÉIQUES.

Le précipité des globulines totales est repris par un volume de NaCl physiologique égal à celui de la fraction non dialysable du sérum (qu'on a rendue au préalable isotonique).

On obtient ainsi deux solutions contenant respectivement le groupe des globulines et celui des albumines.

Le mélange à volumes égaux de ces deux solutions reconstitue le sérum total dilué (du point de vue de sa concentration en protéines).

La valeur de la dilution est égale au double de celle provoquée par le passage de l'eau de dialyse à travers le septum, augmentée de celle (très faible, d'ailleurs, si on utilise une solution de NaCl concentrée) due à l'addition de NaCl à la fraction non dialysable.

Ainsi, dans une expérience où la dilution résultant de l'effet mécanique de la dialyse et de l'isotonisation du groupe des albumines est de 1,7 (1 cent. cube de sérum donne après la dialyse 1 c. c. 7 de liquide surnageant isotonique), le mélange à volumes égaux des deux groupes sera identique, du point de vue de la concentration des protéines, au sérum total dilué 3, 4 fois.

D'autre part, à même volume, ces deux solutions contiennent des quantités différentes de chacun des deux groupes, mais dans un rapport égal à celui suivant lequel ils concourent à la constitution de l'édifice protéique.

L'étude des phénomènes qui suivent l'addition des globulines ou des albumines à un hydrosol colloïdal est effectuée de la façon suivante :

Un volume v de l'hydrosol est additionné de volumes croissants de l'une ou l'autre de ces solutions et chaque mélange est complété à un même volume V . En sorte qu'on obtient pour chaque groupe protéique une série de mélanges d'égal volume dans lesquels le colloïde est sous une concentration déterminée et les protéines sous des concentrations croissantes.

On pourra donc tracer pour chacune des deux solutions pro-

tiques et pour un hydrosol déterminé les graphiques de flocculation comme il en est indiqué au paragraphe II.

Ces phénomènes présentent pour chaque groupe une certaine analogie avec ceux signalés, au début de ce travail, pour le sérum total. Toutes autres choses égales, à mesure que croît le volume sous lequel l'une ou l'autre des solutions est additionnée à l'hydrosol, on constate une zone de non-flocculation précédant et suivant une zone de flocculation.

Toutefois la zone de flocculation due au groupe des globulines est *beaucoup plus étendue* que celle provoquée par le groupe des albumines en sorte qu'il existe une région dans laquelle les globulines sont *floculantes* alors que les albumines ne *le sont plus*.

C'est dans cette région, qui commence en même temps que la deuxième zone de non-flocculation des albumines, qu'apparaît l'antagonisme de ce groupe et celui des globulines.

Cet antagonisme ne réside pas uniquement dans l'opposition des actions floculantes et non floculantes, mais se précise lorsque le colloïde utilisé fait partie de la catégorie citée au paragraphe I.

Le groupe des albumines exerce, en effet, vis-à-vis de leurs granules une action dispersante analogue à celle du sérum total. Cette action se traduit par les mêmes modifications optiques que celles signalées pour les mélanges sérum colloïde et, de plus, est conditionnée de la même façon par les mêmes facteurs que ceux dont dépend le pouvoir de dispersion du sérum total.

La salinité du milieu, la température à laquelle il est porté et le chauffage préalable exercent une influence prépondérante sur les phénomènes qui suivent l'addition du groupe des albumines à un hydrosol colloïdal. Ces mêmes facteurs modifient beaucoup moins, et comparativement d'une façon insensible, l'action exercée sur des granules colloïdaux par le groupe des globulines.

SALINITÉ DU MILIEU. — La présence d'électrolytes modifie profondément le graphique de flocculation du groupe des albumines en diminuant le pouvoir flocculant de ces protéines et en augmentant leur action dispersante. Ainsi que nous l'avons fait

pour le sérum, nous n'envisagerons, actuellement, que le cas particulier des chlorures monovalents, en prenant comme exemple le NaCl.

La diminution du pouvoir flocculant et l'accroissement de l'action dispersante du groupe des albumines augmentent à mesure que croît la concentration du NaCl.

Ainsi les phénomènes présentés par le mélange d'un hydrosol colloïdal et du groupe des albumines sont très différents dans leur intensité suivant que le milieu est salifié ou privé de sel.

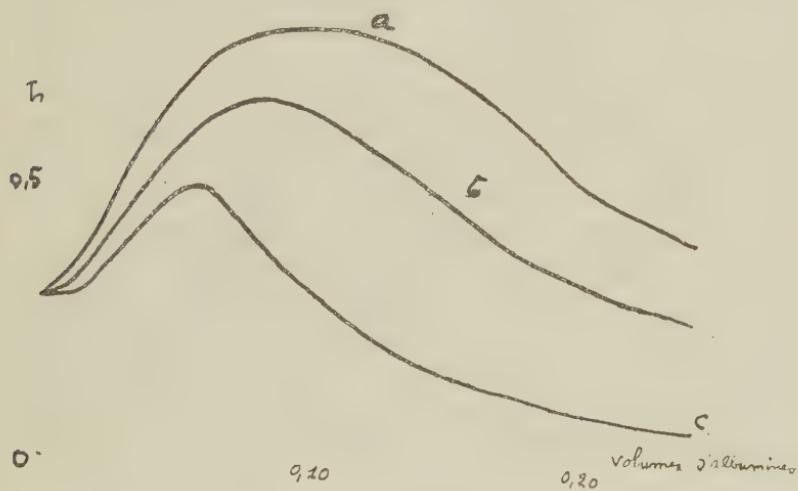


FIG. 4. — Graphiques de flocculation de mélanges de colophane colloïdale (0 gr. 5 p. 1.000) et du groupe des albumines, séparé d'un sérum de bœuf (volume des mélanges 3 cent. cubes) lorsque : a) le milieu est privé de sel; b) le groupe des albumines est isotonique; c) le mélange est isotonique.

C'est ce que montre, en exemple, la figure 4 qui donne les graphiques de flocculation de mélanges identiques du groupe des albumines séparé d'un sérum de bœuf et d'un hydrosol de colophane, dans les conditions suivantes :

- Le groupe des albumines n'est pas rendu isotonique et le milieu est privé de sel.
- Le groupe des albumines est seul isotonique.
- Le mélange albumine-colloïde est isotonique.

La salinité du milieu ne semble pas exercer d'influence sensible sur le pouvoir flocculant du groupe des globulines, tout

au moins jusqu'à la concentration isotonique ainsi que le montrent par exemple les chiffres du tableau IV qui donne pour un mélange de globulines séparées du même sérum de bœuf et d'un hydrosol de colophane les opacités limites (à 15°) en fonction des quantités de NaCl introduites dans le mélange.

TABLEAU IV.

NaCl en grammes p. 1.000 dans	0	2	4	6	8
le mélange	0	2	4	6	8
Opacités limites	0,98	0,96	0,95	0,95	0,94

CHAUFFAGE PRÉALABLE. — Le chauffage préalable du groupe des albumines modifie les actions qu'il exerce sur les granules d'un hydrosol colloïdal de la même façon que le fait la salinité du milieu. En d'autres termes, il diminue son pouvoir flocculant et augmente son action dispersante. Comme pour le sérum total les facteurs temps et température agissent dans le même sens et le point de 55° ne présente aucune particularité.

Le chauffage préalable du groupe des globulines n'exerce, au contraire, pas d'influence très sensible sur son pouvoir flocculant.

C'est ce que montrent les chiffres du tableau V qui donne les opacités limites d'un mélange identique au précédent contenant, au lieu du groupe des albumines, le même volume du groupe des globulines séparé du même sérum de bœuf.

TABLEAU V.

Températures auxquelles a été porté, pendant trente minutes, le groupe des globulines, en degrés	50	55	60	62
Opacités limites du mélange globu- line-colophane.	1,06	1,03	1,00	1,02

CHAUFFAGE DU MÉLANGE PROTÉINE COLLOÏDE. — Le pouvoir flocculant et l'action dispersante exercés par le groupe des albumines subissent respectivement une diminution ou une augmentation par suite du chauffage du mélange albumine-colloïde. Les globulines au contraire voient, dans les mêmes conditions, leur pouvoir flocculant sensiblement augmenté.

Ainsi les deux groupes constitutifs de l'édifice protéique d'un sérum sanguin exercent sur les granules d'un hydrosol colloïdal des actions qui sont *concordantes* ou nettement *antagonistes*.

Le groupe des albumines présente des propriétés semblables à celles manifestées par le sérum total. L'influence qu'il exerce sur les granules d'un hydrosol, d'abord floculante, devient dispersante à mesure que croît la concentration sous laquelle il est additionné à l'hydrosol.

Ces deux propriétés sont conditionnées de la même façon par les mêmes facteurs que les propriétés correspondantes du sérum total. Le groupe des globulines, au contraire, manifeste seulement un pouvoir floculant très prononcé et très étendu que les facteurs précités ne modifient sensiblement pas.

Les graphiques de floculation relatifs à des mélanges iden-

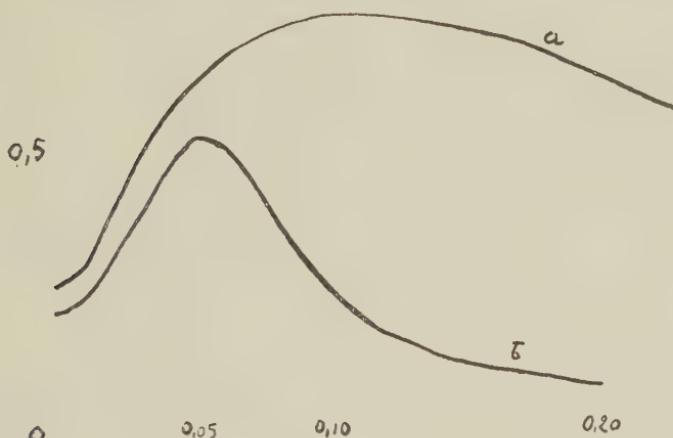


FIG. 5. — Graphiques de floculation de mélanges de colophane (0 gr. 5 p. 1.000), en milieu isotonique, et de solutions des groupes des globulines et des albumines (bœuf) : a) globulines; b) albumines.

tiques d'un colloïde et de l'un ou l'autre de ces groupes montrent nettement la concordance ou l'antagonisme des actions qu'ils exercent sur les granules.

C'est ce qu'on peut constater sur le graphique (fig. 5) relatif à des mélanges isotoniques de globulines ou d'albumines de bœuf et de colophane colloïdale maintenus à la température de 15°.

On doit se demander comment l'addition d'un groupe à l'autre va modifier l'action exercée par ce dernier sur les granules d'un colloïde ?

Or, l'expérience montre que l'addition de globuline au groupe des albumines augmente son pouvoir flocculant et diminue son action dispersante. D'autre part, l'addition de quantités croissantes d'albumines à une solution de globulines diminue son pouvoir flocculant, puis communique au mélange des propriétés dispersantes lorsque la quantité additionnée est suffisamment élevée.

Tout se passe, en somme, comme si les propriétés du mélange résultait des actions combinées de chacun des constituants.

On sait que le mélange à volumes égaux de chacune des

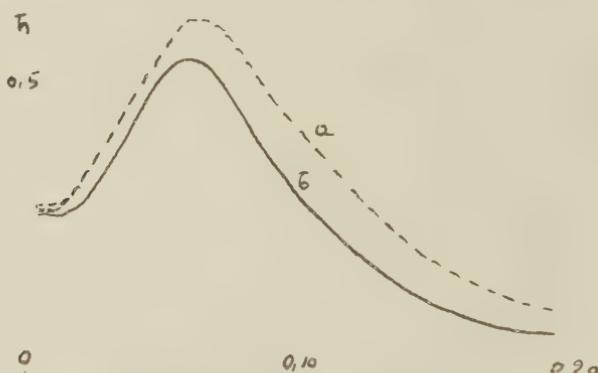


FIG. 6. — Graphiques de flocculation de mélanges de colophane (0 gr. 5 p. 1.000) et de : a) sérum de bœuf dilué trois fois; b) mélanges à volumes égaux des groupes des globulines et des albumines du même sérum.

deux solutions d'albumines et de globulines reconstitue très sensiblement le sérum total dilué.

Il nous a paru intéressant de comparer les actions exercées sur les granules de divers hydrosols par :

- Un sérum total porté à la dilution l par du NaCl (8,5 p. 1.000);
- Le mélange à volumes égaux des solutions d'albumines et de globulines séparées de ce sérum, équivalent au sérum total dilué l fois ($l=3$).

Le graphique (fig. 6) donne en exemple les résultats fournis par un sérum humain et un hydrosol de gomme gutte.

Les graphiques de flocculation relatifs au sérum total et au sérum reconstitué concernent des mélanges isotoniques maintenus à 45°.

L'examen de ces graphiques montre que les actions exercées par le sérum total et par le sérum reconstitué par le simple mélange des deux groupes protéiques sont qualitativement les mêmes et quantitativement très voisines.

Il semble donc que, vis-à-vis des granules d'un colloïde, l'influence exercée par l'édifice protéique, c'est-à-dire par le sérum total, résulte de l'action combinée de l'un et l'autre des groupes dont il est constitué.

Par conséquent, les phénomènes qui suivent l'addition d'un sérum sanguin à un hydrosol colloïdal appartenant à la catégorie citée au paragraphe 1 sont conditionnés à la fois par le pouvoir flocculant du groupe des globulines et par l'action dispersante du groupe des albumines.

Ces résultats présentent un intérêt particulier dans le cas où le colloïde utilisé est un extrait d'organe et où les phénomènes précités jouent un rôle prépondérant dans le séro-diagnostic de la syphilis par les méthodes de précipitation.

Ces faits montrent aussi que la méthode de séparation des groupes constitutifs de l'édifice protéique que nous avons utilisé ne détruit pas l'équilibre colloïdal du sérum.

VI. — RELATION ENTRE LES PROPRIÉTÉS ALEXIQUES ET DISPERSANTES D'UN SÉRUM SANGUIN.

Certaines propriétés biologiques des sérum sanguins, en particulier le pouvoir alexique dirigé contre des globules rouges sensibilisés et le pouvoir hémolytique naturel, sont conditionnées en partie par les mêmes facteurs dont dépend l'action dispersante exercée sur des granules colloïdaux par le sérum total.

Ainsi, le chauffage préalable du sérum qui augmente son action dispersante diminue et même supprime son pouvoir alexique ou hémolytique.

L'augmentation du coefficient pH ou sa diminution abaissent toutes les deux les propriétés biologiques précitées, alors qu'elles accroissent ou diminuent l'action dispersante du sérum.

Il semble que toute augmentation ou diminution notable du pouvoir dispersant d'un sérum entraîne *ipso facto* une décroissance de ses propriétés alexiques ou hémolytiques.

On est donc amené à penser qu'il existe une relation entre ces propriétés biologiques et ces propriétés physiques.

C'est ce que l'expérience nous a permis de vérifier, en particulier pour le sérum humain.

Nous ne donnerons ici qu'un bref résumé des premiers résultats obtenus.

Nous avons mesuré les pouvoirs alexiques au moyen de globules humains sensibilisés par du sérum de lapin anti-humain. Les pouvoirs hémolytiques naturels l'ont été au moyen de globules de mouton.

Les sérums comparés du point de vue de leur pouvoir alexique ou hémolytique l'ont été aussi du point de vue de l'action dispersante qu'ils manifestaient, toutes autres choses égales, vis-à-vis des granules d'un même colloïde.

Ces mesures comparatives ont été effectuées de la façon suivante :

On trace le graphique de flocculation de chaque sérum, pour le colloïde utilisé. Les mélanges des sérums étudiés et de l'hydrosol choisi sont identiques (même concentration granulaire, même volume total), isotoniques et soumis à la même température (37° par exemple).

Dans ces conditions, un sérum sera considéré comme plus disperseur qu'un autre lorsque la branche de son graphique de flocculation, relative à la zone de dispersion, sera placée au-dessous de celle fournie par le sérum auquel il est comparé.

En d'autres termes, pour un mélange déterminé dans lequel les deux sérums seront sous la même concentration, le plus disperseur sera celui dont l'opacité limite est la plus faible.

Les résultats que nous avons obtenus sont très sensiblement les mêmes pour le pouvoir alexique et pour le pouvoir hémolytique.

D'une façon générale, ils se traduisent ainsi :

Le pouvoir alexique ou hémolytique d'un sérum humain est très faible et même nul si le sérum est peu ou très disperseur. Ce n'est que pour une valeur moyenne de son pouvoir disperseur qu'il est notablement alexique ou hémolytique.

Pour être correctes, ces expériences doivent être effectuées autant que possible dans la même journée avec les globules du même individu. On élimine ainsi les différences de résistance globulaire.

Le tableau VI donne en exemple les résultats d'une série d'expériences effectuées de cette façon.

Le pouvoir alexique A indique la dose minima en centimètres cubes du sérum nécessaire pour hémolysier, en trente minutes à 37°, 0 c. c. 1 d'une suspension à 25 p. 100 de globules humains dans le NaCl à 8,5 p. 100 en présence de 0 c. c. 1 de sérum anti-humain, dans un volume total de 2 cent. cubes. Le pouvoir alexique est donc d'autant plus élevé que la valeur de A est plus faible.

Les pouvoirs disperseurs sont caractérisés par l'opacité limite h atteinte par des mélanges isotoniques identiques du colloïde (colophane 0 gr. 5 p. 1.000) et du sérum, contenant dans un volume de 5 cent. cubes le colloïde sous une concentration de 0 gr. 5 par litre et le sérum sous un volume de 0 c. c. 1. Le pouvoir disperseur est donc d'autant plus prononcé que l'opacité limite h est plus faible.

TABLEAU VI.

	NUMÉRO DES SÉRUMS							
	1	2	5	7	10	18	21	25
A	0,9	0,8	0,7	0,4	0,2	0,2	0,6	1,00
h	0,35	0,28	0,15	0,10	0,13	0,12	0,05	0,03

Ces faits nous permettent donc de penser qu'il existe une relation entre le pouvoir alexique ou hémolytique d'un sérum et la propriété qu'il manifeste de disperser les granules d'un hydrosol.

Il semble que toute augmentation ou diminution trop accentuée de cette propriété physique se répercute sur les propriétés biologiques précitées.

Nous consacrerons à cette question, dont l'importance s'impose d'elle-même, une étude plus détaillée.

CONCLUSIONS.

a) L'addition d'un sérum sanguin à un hydrosol colloïdal donne lieu, à mesure que croît la concentration sous laquelle il est ajouté, à une zone de non-flocculation précédent et suivant une zone de flocculation. Alors que dans la première zone de

non-flocculation les granules du colloïde sont sensibilisés par les protéines sériques, ils sont au contraire protégés dans la deuxième zone de non-flocculation.

Lorsque le colloïde appartient à la catégorie des gommes, des résines ou à celle des extraits d'organes l'addition de quantités croissantes d'un sérum sanguin est suivie des mêmes phénomènes, mais dans la deuxième zone de non-flocculation les protéines sériques possèdent en outre la curieuse propriété de disperser les granules de l'hydrosol.

Cette action dispersante, qui se traduit en particulier par un éclaircissement progressif du mélange sérum-colloïde, est conditionnée, ainsi que l'action flocculante, par divers facteurs, dont les principaux sont : la salinité du milieu et le chauffage préalable du sérum. L'étude de l'influence exercée par les électrolytes (qui dépend de leur nature et de leur concentration) est limitée dans ce travail aux chlorures monovalents, pris sous la concentration isotonique. Leur addition au mélange sérum-colloïde diminue le pouvoir flocculant du sérum et augmente son action dispersante. Le chauffage préalable du sérum exerce une action analogue, c'est-à-dire diminue son pouvoir flocculant et augmente son action dispersante. La durée de chauffe et la température à laquelle est porté le sérum agissent dans le même sens. Au cours de ces expériences le point de 55° ne révèle aucune particularité.

b) Dans le but de rechercher si les actions flocculantes et dispersantes sont la propriété du sérum total ou de quelques-uns de ses constituants, nous avons été amené à procéder à la séparation des groupes constitutifs de l'édifice protéique.

Nous avons constaté que la dialyse d'un sérum sanguin permet, sans détruire l'équilibre du groupe des albumines, de séparer le groupe des *globulines totales* privé de toute protéine étrangère à condition que l'eau distillée utilisée pour la dialyse ait un coefficient *pH* compris dans des limites déterminées.

Le groupe des albumines comprend, outre la sérine, une lipoprotéine séparable grâce à une zone d'instabilité qu'elle présente, en l'absence d'électrolytes, vis-à-vis des ions hydrogène.

c) Chacun de ces groupes, celui des globulines totales et celui des albumines (sérine et lipoprotéine), additionné en

quantités croissantes à un hydrosol colloïdal, donne lieu, comme le sérum total, à une zone de flocculation précédée et suivie d'une zone de non-flocculation.

Toutefois la zone de flocculation due au groupe des globulines est beaucoup plus étendue que celle provoquée par le groupe des albumines. Il en résulte que, durant toute une région, qui commence en même temps que la deuxième zone de non-flocculation des albumines, ce dernier groupe n'est plus flocculant alors que les globulines le sont encore très fortement.

D'autre part le groupe des albumines possède dans cette zone les propriétés dispersantes déjà signalées pour le sérum total.

Or, les facteurs qui conditionnent le pouvoir de dispersion d'un sérum total conditionnent aussi de la même façon l'action dispersante du groupe des albumines sans influencer sensiblement le pouvoir flocculant du groupe des globulines.

Ces faits montrent l'antagonisme qui existe entre le groupe des globulines et celui des albumines.

D'autre part les propriétés flocculantes et dispersantes d'un sérum total se révèlent comme le résultat des actions combinées de chacun des deux groupes constitutifs de l'édifice protéique.

Ces résultats prennent une importance toute particulière dans le cas où le colloïde utilisé est un extrait d'organe.

d) L'action dispersante d'un sérum sanguin conditionne son pouvoir alexique. Les relations qui semblent exister entre ces propriétés physique et biologique apportent (comme nous le montrerons au cours d'une publication ultérieure) une contribution intéressante à la connaissance du mécanisme alexique.

BIBLIOGRAPHIE

ACHARD (Charles) et BOUTARIC (Augustin). *C. R.*, 195, 1932, p. 1196.
BARY (Paul). *Les colloïdes*. Dunod, Paris.
BOUTARIC (A.). *Les colloïdes et l'état colloidal*. Librairie Félix Alcan.
BOUTARIC (A.) et MORIZOT. *Archives de Physique biologique*, n° 2, 1933.
DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, Roux (Étienne) et KOSSOVICH (N.). Ces *Annales*, 53, p. 1282.
HO DAC AN. *Thèse Paris*, 1933.
MACHEBOEUF. *Thèse Fac. Sciences*, Paris.
PIETTRE (Maurice). *C. R.*, 190, 1930, p. 1012.
VERNES. *Publication de l'Institut prophylactique*, fascicule 1.

**ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ
DES CHENILLES DE *GALLERIA MELLONELLA*
ENVERS
LES DIFFÉRENTS TYPES DE BACILLES TUBERCULEUX**

par M^{me} M. BIROU.

HISTORIQUE.

Metchnikoff, le premier, a eu cette idée que les animaux capables de digérer la cire devaient être réfractaires à la tuberculose. Les animaux qui se nourrissent de cire sont très rares dans la nature. Il y en a un, cependant, connu depuis longtemps, c'est la mite des abeilles, *Galleria mellonella*, dont les chenilles habitent les ruches et se nourrissent de cire. Son mode de vie, son organisation interne, sa nutrition et ses particularités biologiques furent étudiés et décrits avec beaucoup de détails dans les nombreux travaux de Métalnikov.

Ce petit insecte est remarquable par son immunité parfaite vis-à-vis de la tuberculose ; ce fait intéressant fut découvert par Métalnikov qui l'a étudié ensuite, seul ou en collaboration avec ses élèves, dans toute une série de travaux. Il a montré que les bacilles tuberculeux, introduits dans la cavité du corps de la chenille, sont phagocytés avec une extrême rapidité et sont digérés ensuite à l'intérieur des leucocytes. La digestion des bacilles se poursuit dans les cellules géantes formées par plusieurs leucocytes accolés et fusionnés les uns avec les autres et qui captent des quantités considérables de bacilles. Les cellules géantes se transforment ensuite en capsules en s'entourant d'une couche de leucocytes étirés et tassés les uns sur les autres. Les bacilles injectés sont détruits en masse à l'intérieur de ces formations et leur digestion aboutit à la production d'un pigment noir-brun, qui forme des taches noires bien visibles, même à l'œil nu, dans la cavité du corps de la chenille. Cette destruction des bacilles tuberculeux, soit à l'inté-

rieur des leucocytes isolés, soit à l'intérieur des cellules géantes, se fait avec une grande rapidité.

Ces recherches sur l'immunité des chenilles de *Galleria mellonella* furent reprises en France et en d'autres pays par plusieurs auteurs (Fiessinger, Hollande, Nedrigailoff) qui ont tous confirmé les observations de Métalnikov.

Eu continuant les expériences de Métalnikov, nous nous sommes proposé d'étudier le comportement des chenilles de *Galleria mellonella* envers les différents types de bacilles tuberculeux et nous avons insisté en particulier sur le mode de destruction des bacilles dans le corps de la chenille.

TECHNIQUE.

En ce qui concerne le côté technique de nos expériences, nous nous sommes servis surtout des méthodes élaborées par Métalnikov et dont nous donnons ici une brève description. Les injections de bacilles tuberculeux aux chenilles ont été faites au moyen de pipettes Pasteur recourbées et graduées en 1/100 ou 1/200 de centimètre cube. Pour avoir une graduation exacte, nous avons opéré de la manière suivante : nous mesurions 0 c. c. 1 d'eau distillée dans un petit tube en verre au moyen d'une pipette graduée stérile et nous aspirions cette eau dans une pipette Pasteur dont la partie fine doit être d'un diamètre constant. Le point où s'arrête l'eau aspirée est marqué d'un trait et l'espace entre ce trait et le bout de la pipette est divisé en dix parties égales. On obtient ainsi une pipette graduée en centièmes de centimètres cubes ; le bout de la pipette doit être très effilé pour ne pas déchirer les téguments de l'insecte au moment de l'injection. Au moyen d'une pareille pipette, on arrive à injecter aux chenilles des quantités très précises de l'émulsion microbienne et, en connaissant la densité de l'émulsion, on calcule les doses de bacilles injectées par rapport au poids de la chenille. Les chenilles injectées sont mises dans de petits bocaux en verre et placées à l'étuve à 30°-37°.

Pour faire des prises de sang, nous avons employé des tubes capillaires très effilés d'un côté. La goutte de sang est étalée sur la lame au moyen d'une lamelle ou du tube capillaire. Les frottis ainsi préparés sont fixés à l'alcool méthylique.

Pour la coloration des frottis, nous avons utilisé les trois méthodes suivantes : 1^o coloration à la fuchsine de Ziehl à chaud (on tient la lame couverte de la solution colorante sur la flamme de la veilleuse du bec Bunsen jusqu'à l'apparition des vapeurs); différenciation avec NO³H 20 p. 100 et à l'alcool absolu; lavage à l'eau du robinet; comme coloration complémentaire, nous avons employé ordinairement le bleu de méthylène; 2^o coloration à la fuchsine de Ziehl pendant vingt minutes à 37° (la lame immergée dans un bain rempli du colorant est placée à l'étuve). Différenciation à l'alcool lactique 5 p. 100; coloration complémentaire, hémalun Meyer pendant dix minutes; lavage à l'eau et, finalement, acide picrique en solution alcoolique saturée; 3^o coloration par la solution de May-Grunwald, d'abord pure, puis

mélangée à l'eau distillée pendant cinq à six minutes; ensuite, coloration à la fuchsine de Ziehl pendant vingt minutes à 37°; différenciation par l'alcool lactique 5 p. 100; lavage à l'eau de robinet et coloration par le bleu d'Unna en solution dans l'eau ordinaire pendant dix minutes.

Pour préparer les coupes des chenilles inoculées, nous avons employé comme fixateur le sublimé bouillant (solution saturée acidifiée par l'acide acétique). La fixation dans ce liquide dure une demi-heure et les morceaux fixés sont placés ensuite pendant vingt-quatre heures dans l'alcool à 70° additionné de teinture d'iode.

Nous nous sommes servis aussi avec beaucoup de succès du mélange de Duboscq-Brasil (ou Bouin alcoolique); pour que la fixation soit suffisante, il faut en général de vingt-quatre heures à trois jours et on transporte ensuite les morceaux fixés dans l'alcool à 80°.

L'inclusion à la paraffine a été faite d'après la méthode de Levaditi. Pour la coloration des coupes (généralement 2 μ d'épaisseur), nous avons employé soit le procédé à la fuchsine de Ziehl — hémalun Meyer — acide picrique, soit le procédé à la fuchsine Ziehl — bleu de méthylène.

Nous avons pris pour nos recherches les 6 types du bacille tuberculeux : humain, bovin, aviaire, pisciaire, le BCG et le bacille homogène. Les réactions de défense provoquées dans le corps de la chenille par l'injection de ces microbes ont de nombreux points communs; nous allons d'abord décrire, avec tous ses détails, le processus de la lutte de la chenille contre un seul type de bacille tuberculeux, par exemple le bacille de Vallée; ensuite, nous indiquerons toutes les particularités concernant chacune des autres variétés citées ci-dessus.

BACILLE DE VALLÉE. — Nous avons fait un grand nombre d'expériences pour étudier l'immunité des chenilles de *Galleria mellonella* envers le bacille de Vallée et nous devons conclure que cette immunité est purement cellulaire; jamais nous n'avons vu des bacilles tuberculeux type Vallée subir l'action des anticorps dans le sang de la chenille. Par contre, la phagocytose est très intense et commence aussitôt après l'injection. Sans doute, c'est la réaction essentielle de défense de l'organisme de la chenille et toutes les formations cellulaires qui apparaissent plus tard, telles les cellules géantes et les capsules, ne font que continuer et achever le travail commencé par les phagocytes.

PHAGOCYTOSE. — L'englobement des bacilles tuberculeux type Vallée par les leucocytes commence quinze minutes après

l'injection ; deux à quatre heures plus tard, on ne voit plus de bacilles libres dans le sang; ils ont tous été captés par les leucocytes.

Conformément à ce que dit Hollande, ce sont surtout les leucocytes qui prennent part à la phagocytose; les proleucocytes n'interviennent que plus tard et leur nombre augmente surtout le lendemain de l'expérience et les jours suivants.

Quant aux cellules sphéruléuses, on ne les voit participer à la phagocytose que tout à fait exceptionnellement.

Voici un exemple de la variation de la formule leucocytaire après une injection de bacilles de Vallée.

	LEUCOCYTES	PROLEUCOCYTES	SPHÉRULÉUSES
Avant l'injection	61	36	3
6 heures après l'injection	26	71	3
24 heures après l'injection	10	82	8
48 heures après l'injection	2	85	13

Les cellules prenant part à la phagocytose présentent souvent des vacuoles autour des microbes englobés. L'injection d'une très forte dose de bacilles de Vallée (correspondant par exemple à 1/100 du poids de la chenille) produit souvent une vacuolisation complète du protoplasma leucocytaire (Voir Pl. fig. *b*). Les bacilles englobés commencent bientôt à subir l'action des sucs digestifs des leucocytes, ils perdent leur colorabilité par la fuchsine, se gonflent et se transforment en gros bâtonnets bruns; une partie des bacilles tuberculeux en voie de digestion se présentent comme transformés en quelques petites granulations, généralement au nombre de trois pour chaque bacille, d'abord rouges, puis noires (V. Pl. fig. *1*).

La digestion des bacilles tuberculeux type Vallée commence généralement quatre à cinq heures après l'injection et c'est vers ce moment qu'on voit apparaître dans les leucocytes des petites taches sombres formées par des bacilles en voie de digestion.

On trouve quelquefois dans le sang des chenilles injectées de petits plasmodes formés par quelques leucocytes ayant phagocyté des bacilles et accolés les uns aux autres (V. pl. fig. *e*). Ce sont des ébauches de cellules géantes dont on voit les exemples plus nets et plus démonstratifs sur les coupes des chenilles injectées.

CELLULES GÉANTES ET CAPSULES. — Les cellules géantes sont formées par plusieurs leucocytes accolés les uns aux autres et entourant ainsi de tous les côtés quelques cellules ayant absorbé une grande quantité de bacilles tuberculeux. Ce sont les leucocytes proprement dits qui concourent à la formation de ces plasmodes.

Malgré l'affirmation de Hollande de n'avoir jamais vu de

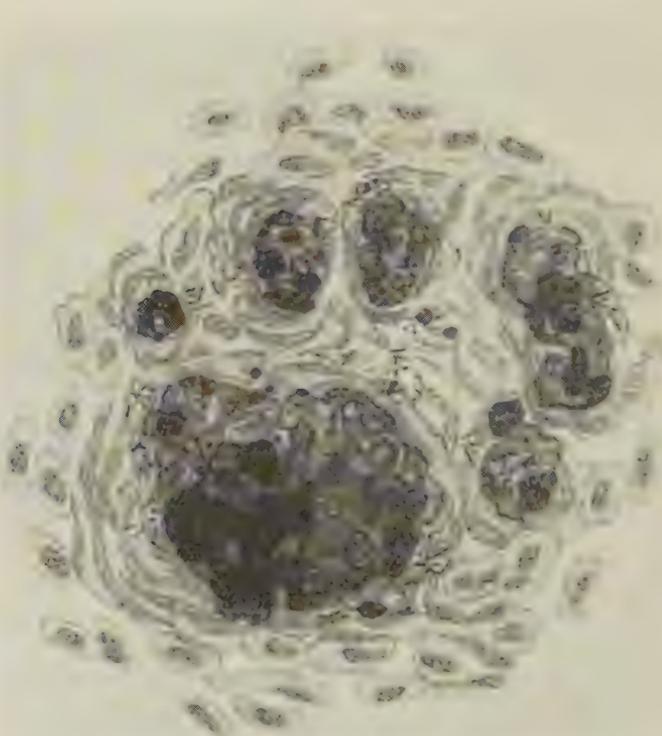


FIG. 4.

fusion du protoplasme des leucocytes dans les cellules géantes, nous l'avons observée très nettement, non seulement avec le bacille de Vallée, mais aussi avec tous les autres types de bacilles tuberculeux (V. pl. fig. 9), sauf avec le bacille aviaire.

De nouveaux leucocytes affluent au plasmode primitif; étirés et serrés les uns contre les autres, ils se disposent en couche continue autour de la cellule géante, et il se forme ainsi

une capsule. Vingt-quatre heures après l'injection, on constate déjà sur les coupes l'apparition des premières capsules, mais elles sont beaucoup plus nettes trois, cinq, neuf jours après l'injection. Vers cette époque, la couche externe des leucocytes devient plus épaisse, tandis que les leucocytes de la cellule géante primitive dégénèrent, et l'intérieur de la capsule pré-



FIG. 2.

sente un tissu plus ou moins homogène parsemé de débris du noyau et de bacilles en voie de digestion (V. pl. fig. h).

Sous cet aspect, la capsule des chenilles de *Galleria mellonella* rappelle d'une certaine manière le tubercule des mammifères. On voit souvent plusieurs petites capsules groupées ensemble et entourées d'une couche commune de cellules (V. fig. 1). Les capsules sont situées surtout dans le tissu adipeux, près de la périphérie du corps de la chenille.

Les capsules se retrouvent sur les coupes des chrysalides et des papillons issus des chenilles inoculées ; elles semblent alors être déplacées tout près des téguments de l'insecte et forment ainsi un anneau presque continu (V. fig. 2).

La destruction des bacilles tuberculeux à l'intérieur des cellules géantes et des capsules se fait exactement de la même manière que dans les phagocytes isolés. En examinant au microscope le contenu d'une capsule, on voit les mêmes formes de destruction du bacille (V. pl. fig. 7). Des amas de ces bacilles digérés ou en voie de digestion forment le pigment brun-noir dont les taches caractéristiques se retrouvent dans toutes les cellules géantes et à l'intérieur de toutes les capsules. Plus la digestion des bacilles est poussée, plus ces taches sont marquées.



FIG. 3.

quées. Des points noirs de ce pigment sont visibles même à l'œil nu sur le corps de la chenille à travers les téguments (V. fig. 3). Ils commencent à apparaître vingt-quatre-trente heures environ après l'injection et sont accumulés surtout dans le bout postérieur du corps. La rapidité et l'intensité de toutes ces réactions de défense contre les bacilles tuberculeux sont remarquables et ne font que confirmer l'intéressante découverte de Métalnikov — l'immunité parfaite des chenilles de *Galleria mellonella* envers la tuberculose.

DOSSES MORTELLES. — Nous avons pu déterminer la dose mortelle de bacilles de Vallée pour les chenilles. En augmentant

progressivement les doses injectées, nous sommes arrivée à inoculer aux chenilles des quantités considérables de bacilles tuberculeux.

	DOSES INJECTÉES en milligrammes	DOSES INJECTÉES par rapport au poids de la chenille	
1 ^o	0,2	1/1.000	Toutes les chenilles restent vivantes.
2 ^o	0,3	1/666	Toutes les chenilles restent vivantes.
3 ^o	0,5	1/400	2 chenilles mortes sur 6.
4 ^o	1	1/200	2 chenilles mortes sur 6.
5 ^o	1,5	1/133	3 chenilles mortes sur 6.
6 ^o	1,7	1/120	4 chenilles mortes sur 6.
7 ^o	2	1/100	Toutes mortes après 3 jours.
8 ^o	3	1/66	Toutes mortes après 48 heures.

Ainsi, la dose mortelle est constituée par 2 milligrammes de bacilles tuberculeux, ce qui correspond à 1/200 environ du poids de la chenille (la chenille adulte pèse 0,15-0,20 grammes environ). D'après Saenz et Costil, il suffit d'injecter 1/200.000 de milligramme de bacilles tuberculeux de la souche Vallée au cobaye pour déterminer une tuberculose grave. Par conséquent, la dose mortelle de bacilles de Vallée pour la chenille est équivalente à 200.000 doses mortelles pour le cobaye. Les chenilles inoculées de doses très fortes de bacilles de Vallée (correspondant à 1/100 de leur poids par exemple) présentent les mêmes réactions de défense que nous avons vues précédemment, c'est-à-dire la phagocytose, la formation de capsules et de cellules géantes et la destruction des bacilles avec la production du pigment brun-noir. Mais, lorsque la dose injectée atteint 3 ou 4 milligrammes (ce qui correspond à 1/60 et 1/50 du poids de la chenille), on observe une forte vacuolisation des leucocytes; la phagocytose est peu poussée; on ne voit plus de capsules ni de cellules géantes sur les coupes de chenilles, mais un grand nombre de taches du pigment noir disséminées dans les tissus. Les taches sont formées par des amas de bacilles tuberculeux en voie de destruction. Des leucocytes fortement vacuolisés entourent ces masses de bacilles en partie digérés, mais on ne voit plus la fusion des leucocytes en plasmodes ni la formation de capsules. Les chenilles inoculées de doses aussi fortes noir-

cissent très rapidement (quelques heures après l'injection) et meurent en vingt-quatre-trente heures.

BACILLE HUMAIN. — Une injection de bacilles type Rati aux chenilles de *Galleria mellonella* provoque les mêmes réactions que le bacille Vallée, c'est à-dire la phagocytose, la formation des cellules géantes et des capsules, et l'apparition du pigment noir. La phagocytose se produit rapidement, la digestion des bacilles englobés commence sept-huit heures après l'injection. L'aspect des capsules est le même que dans le cas du bacille de Vallée. Les chenilles injectées se transforment généralement en chrysalides et en papillons.

BCG. — Du point de vue des réactions de défense, le BCG ne présente pas de grande différence avec le bacille de Vallée et le bacille Rati. La destruction des bacilles dans les leucocytes isolés et à l'intérieur des cellules géantes et des capsules se fait avec la même rapidité.

BACILLE HOMOGÈNE. — Par contre, le bacille homogène se montre plus virulent pour les chenilles que les bacilles précédents. La phagocytose ne se produit pas aussi rapidement et la digestion des bacilles phagocytés ne commence généralement que quinze-vingt heures après l'injection.

On observe souvent une certaine quantité de bacilles libres dans le plasma vingt-quatre heures après l'injection. Ce fait tient en partie à ce que les leucocytes, ayant capté trop de bacilles tuberculeux, éclatent et libèrent ainsi les bacilles englobés ; ceux-ci seront de nouveau captés par les proleucocytes dont le nombre augmente considérablement après l'injection. Le nombre des cellules sphéruleuses s'accroît aussi.

Voici un exemple de la variation de la formule leucocytaire après une injection de bacille homogène.

	LEUCOCYTES	PROLEUCOCYTES	SPHÉRULEUSES
Avant l'injection	65	32	3
8 heures après l'injection	20	69	11
24 heures après l'injection	43	72	15
48 heures après l'injection	1	74	25

Nous avons essayé d'injecter aux chenilles une émulsion assez épaisse de bactéries homogènes, et nous avons observé une multiplication des bactéries tuberculeux dans le plasma des chenilles ayant reçu une dose correspondant à 1/200 de leur poids. La phagocytose commence aussitôt après l'injection, mais cinq ou six heures après, malgré une grande quantité de bactéries phagocytées, on en voit encore beaucoup dans le plasma. Le nombre des bactéries libres augmente le jour suivant et on les voit se disposer dans le plasma sous forme de rameaux.

Les bactéries tuberculeux se multiplient dans le sang de la chenille. A ce moment, la formule leucocytaire reste encore inchangée. Ce n'est que quarante-huit heures après l'injection que les proleucocytes apparaissent en grand nombre et, en phagocytant les bactéries, les font disparaître du plasma. Malgré cela, les chenilles dans le sang desquelles nous avons observé une multiplication des bactéries tuberculeux meurent généralement trois ou quatre jours après l'injection.

Les bactéries tuberculeux homogènes se montrent, en somme, plus résistants vis-à-vis des sucs digestifs leucocytaires des chenilles que les bactéries précédents; ils gardent longtemps leur acido-résistance; nous avons vu beaucoup de bactéries colorables par la fuchsine dans les capsules des chrysalides issues des chenilles inoculées de bactérie homogène [fixées dix-douze jours après l'injection] (V. pl. fig. *h*).

LE BACILLE' PISCIAIRE est intéressant surtout par la modification qu'il provoque à l'intérieur des phagocytes. Une heure après l'injection on aperçoit déjà des petites vacuoles à l'intérieur des leucocytes. A l'intérieur de ces vacuoles se trouvent généralement quelques bactéries englobées qui commencent bientôt à subir l'action des sucs digestifs et se transforment en gros bâtonnets noirs ou incolores. Le nombre des vacuoles s'accroît dans la suite et elles augmentent de dimensions, de sorte que six-huit heures après l'injection on ne voit presque plus de leucocytes intacts, mais le protoplasma de la plupart d'entre eux est fortement vacuolisé.

Quant à la formation des cellules géantes et des capsules, il n'existe pas de différence entre le bacille pisciaire et les autres types du bacille tuberculeux.

BACILLE AVIAIRE. — L'immunité des chenilles de *Galleria mellonella* envers le bacille aviaire se manifeste par des réactions différentes de celles que nous avons vues précédemment. Les cas de phagocytose sont très rares. Jamais nous n'avons vu de cellules géantes, ni de capsules, sur les coupes des chenilles inoculées. Par contre, on observe dans le sang des chenilles une véritable lyse des bacilles tuberculeux.

BACTÉRIOLYSE. — Nous avons injecté aux chenilles de très fortes doses (correspondant à 1/150 de leur poids environ) de

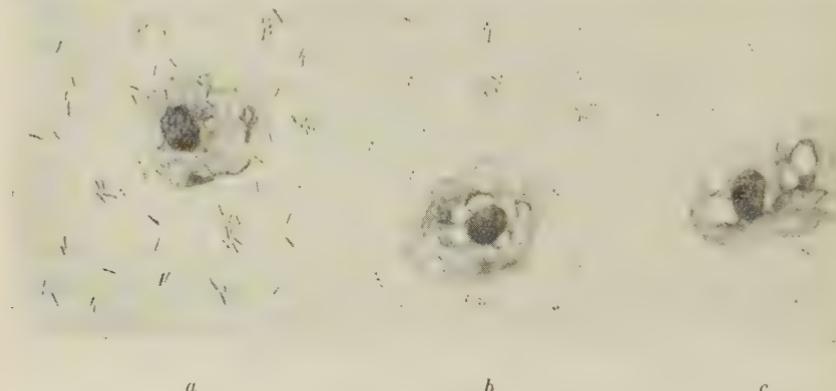


FIG. 4.

bacilles aviaires de la collection de l'Institut Pasteur. Nous n'avons trouvé sur les frottis de sang faits douze à quinze minutes après l'injection que quelques très rares bacilles isolés. Toute la masse des bacilles inoculés disparaît on ne sait où.

Alors, en faisant des prises de sang presque immédiatement après l'injection, nous avons pu observer une lyse des bacilles tuberculeux. Deux minutes après l'injection d'une émulsion très épaisse de bacilles aviaires, on trouve dans le plasma de la chenille une grande quantité de bacilles tuberculeux, la plupart intacts et colorables par la fuchsine, d'autres transformés en petites granulations rouges ou noires (V. fig. 4, a). Trois minutes après l'injection, on voit très peu de bacilles, mais le champ du microscope est rempli de granulations rouges et

noires qui se rassemblent souvent en amas. Sur le frottis suivant, fait cinq minutes après l'injection, on ne voit dans le champ du microscope que deux ou trois granulations noires; toutes les autres disparaissent comme dissoutes dans le plasma. La rapidité de ce phénomène est vraiment remarquable.

Les leucocytes des chenilles inoculées de bacilles aviaires présentent dès le début de l'expérience un aspect tout à fait anormal; très fortement vacuolisés, ils perdent leurs contours ordinaires et ne sont souvent représentés que par des noyaux entourés des restes à peine visibles du protoplasme. Les cas de phagocytose sont très rares; jamais l'index phagocytaire ne s'élève au-dessus de 5 à 6 p. 100. Dans le cas de bacille aviaire, la destruction des bacilles se produit surtout dans le plasma. En faisant varier les doses injectées du 1/1.000 au 1/100 du poids de la chenille, nous avons observé le même phénomène. Jamais nous n'avons vu de cellules géantes, ni de capsules sur les coupes des chenilles inoculées de bacilles aviaires. On ne voit que de simples amas de leucocytes aussi vacuolisés que les leucocytes du sang, situés surtout dans le tissu adipeux de la chenille et qui ne sont pas des cellules géantes au vrai sens du mot, car on ne voit pas la fusion du protoplasme. Les leucocytes, qui dégénèrent dans la suite, entourent des masses considérables de bacilles tuberculeux qui subissent la même désintégration que dans le plasma, c'est-à-dire la transformation en granulations rouges et noires. On ne voit pas de gros bâtonnets gonflés comme on en observe avec tous les autres types de bacilles tuberculeux. Dix minutes après l'injection, une partie des bacilles accumulés au sein de ces amas leucocytaires est déjà transformée en granules. Leur nombre s'accroît rapidement et des masses de ces bacilles en voie de digestion forment des taches de pigment brun-noir, exactement comme nous l'avons vu au cours de nos expériences avec le bacille de Vallée. Seulement, dans le cas du bacille aviaire, ces taches de pigment ne se trouvent pas à l'intérieur des capsules et des cellules géantes, mais sont disséminées simplement dans les tissus de la chenille (V. pl. fig. d).

Malgré des apparences aussi différentes, on a probablement affaire dans les deux cas au même phénomène, la destruction des bacilles tuberculeux par les fermentes intraleucocytaires de

la chenille. Dans le cas du bacille de Vallée (ainsi que dans celui de tous les autres types de bacilles tuberculeux dont l'injection est suivie de la phagocytose et de l'apparition des cellules géantes et des capsules), ces ferment agissent à l'intérieur des phagocytes, tandis qu'une injection de bacilles aviaires provoque une forte destruction des leucocytes, et les ferment digestifs ainsi libérés attaquent les bacilles tuberculeux qui se trouvent dans le plasma.

RÉSUMÉ.

1^o Les chenilles de *Galleria mellonella* sont entièrement réfractaires à la tuberculose, quel que soit le type du bacille tuberculeux inoculé.

2^o Cette immunité est purement cellulaire; les bacilles tuberculeux injectés sont toujours détruits par les ferment leucocytaires.

3^o Nous avons pris pour nos recherches 6 types de bacilles tuberculeux : Vallée, humain, pisciaire, aviaire, homogène et BCG.

a) Le bacille de Vallée, si virulent pour les cobayes, se montre presque inoffensif pour les chenilles. La chenille réagit à l'injection par une phagocytose intense et par la formation de cellules géantes et de capsules. Les bacilles tuberculeux subissent la même désintégration dans les leucocytes isolés et à l'intérieur des cellules géantes et des capsules; ils perdent leur acido-résistance, se gonflent et se transforment en granulations et bâtonnets noirs. Cette destruction des bacilles aboutit toujours à la formation d'un pigment brun-noir dont les taches se retrouvent aussi dans les chrysalides et dans les papillons issus de chenilles inoculées. Quant aux doses mortelles, nous avons trouvé que la chenille succombe à l'injection d'une dose correspondant au 1/100 environ de son poids.

b) Les injections de BCG et de bacille humain sont suivies aussi de phagocytose et de formation de cellules géantes et de capsules.

c) Le bacille pisciaire, tout en provoquant les mêmes réactions de défense, détermine une forte vacuolisation des phagocytes.

d) Le bacille homogène se montre plus virulent pour les chenilles que les souches précédentes. Les bacilles gardent longtemps leur acido-résistance, et nous avons observé la multiplication des bacilles injectés dans le sang de la chenille.

e) Le bacille aviaire est remarquable par le fait qu'il provoque une très forte vacuolisation des leucocytes et la destruction des bacilles injectés se produit dans le plasma avec une grande rapidité, tandis que les réactions cellulaires manquent totalement.

Je suis heureuse de remercier M. le professeur Métalnikov de son appui toujours si bienveillant et de ses précieux conseils qui ont guidé mes premiers pas dans le domaine des recherches expérimentales.

LÉGENDE DE LA PLANCHE I

- a)* Phagocytose du bacille de Vallée, cinq heures après l'injection.
- b)* Les leucocytes de la chenille quatre heures après l'injection d'une forte dose de bacille de Vallée (correspondant au 1/100 du poids de la chenille).
- c)* Formation du pigment noir dans les leucocytes de la chenille, vingt-quatre heures après l'injection.
- d)* Une tache de pigment noir, deux jours après une injection de bacille aviaire.
- e)* Formation des cellules géantes dans le sang d'une chenille inoculée de bacille de Vallée (vingt-quatre à quarante-huit heures après l'injection).
- f)* Destruction des bacilles tuberculeux type Vallée dans les cellules, quarante-huit heures après l'injection.
- g)* Une cellule géante, quarante-huit heures après l'injection de bacilles de type humain.
- h)* Capsule d'une chrysalide issue d'une chenille inoculée de bacille homogène, douze jours après l'injection.

ÉTUDE SUR LA MORPHOGÉNÈSE DES CORPS DE NEGRI

par S. NICOLAU et L. KOPCIOWSKA (1).

(*Institut Pasteur*).

MATÉRIEL UTILISÉ.

a) Dans un travail précédent (2), nous avons étudié la dispersion du virus rabique des rues dans le système nerveux du lapin, après inoculation dans un nerf sciatique. Le virus utilisé était une souche rabique des rues qui provoquait l'apparition, au moment des expériences, d'environ 20 à 40 p. 100 de corps de Negri dans la corne d'Ammon (3) des lapins inoculés par voie cérébrale. Nous avons introduit ce virus dans le sciatique droit de 12 lapins ; les animaux ont été sacrifiés, par saignée totale, entre quatre et douze jours après l'inoculation. Ceux sacrifiés le neuvième, le dixième et le douzième jour présentaient des signes cliniques nets de myélite, allant, pour le dernier, jusqu'à une paralysie rabique totale (4). Le système nerveux de ces lapins a servi d'un côté à l'étude de la dispersion des germes, question qui a fait le sujet du travail signalé plus haut, d'un autre côté à l'étude des corps de Negri.

b) D'autres lapins, inoculés toujours par voie intrasciatique, avec la même souche de virus, ont été sacrifiés deux, trois et quatre jours après l'inoculation.

c) Enfin, le plus grand lot d'animaux d'étude nous a été fourni par des lapins ayant servi aux expériences de transformation d'un virus rabique fixe en virus des rues (5).

(1) Une partie de ce travail a été faite en collaboration avec G. Balmus.

(2) NICOLAU et KOPCIOWSKA. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 262.

(3) La manière dont nous faisons le dénombrement des corps de Negri dans la corne d'Ammon est expliquée dans un mémoire précédent. S. Nicolau, C. Mathis et Val. Constantinesco. *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 778.

(4) Les lapins inoculés dans le sciatique avec ce virus succombent toujours à la rage, au bout de quinze à vingt-cinq jours, après un état paralytique variant de trois à sept jours.

(5) NICOLAU et KOPCIOWSKA. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, **198**, 1934, p. 622.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Les lots a et b, réunis, formaient un ensemble d'animaux dont la mort a été provoquée de vingt-quatre heures à douze jours après l'inoculation de virus dans le nerf sciatique. Nous avons pu étudier l'intensification progressive des lésions dans le système nerveux périphérique (ganglions spinaux) ainsi que dans le névraxe ; nous avons pu surprendre, de même, la formation des premières ébauches de corps de Negri dans les neurones des ganglions spinaux (les premières cellules sensibles au contact avec le virus inoculé dans le sciatique), et poursuivre la formation des inclusions jusqu'au stade final de corps de Negri caractéristiques. Parallèlement à l'étude des inclusions prenant naissance dans les neurones des ganglions spinaux, nous avons poursuivi la formation de ces mêmes inclusions dans les cellules nerveuses de la moelle, ainsi que du cerveau (écorce, corne d'Ammon, noyaux optiques basaux).

Le lot c, composé d'une cinquantaine de lapins, a complété heureusement les deux lots précédents. En effet, les animaux, inoculés dans le nerf sciatique, étaient ou sacrifiés pendant leur paralysie rabique, ou abandonnés à l'évolution normale de l'état paralytique, jusqu'à la mort ; ce qui nous a procuré du matériel d'étude provenant de lapins sacrifiés ou morts de quinze à vingt-cinq jours après l'inoculation.

Voici les considérations qui ont dirigé les expériences nous ayant fourni le matériel anatomo-pathologique de ce *lot c* :

Une des particularités principales conférées au virus rabique fixe par l'adaptation exclusive à l'encéphale du lapin, particularité mise en évidence surtout par les travaux de Babes, de Schiffman, de Levaditi, Nicolau et Schoen, est la perte de la propriété de provoquer la formation des corps de Negri dans la corne d'Ammon ; inoculé par Ch. Nicolle et Et. Burnet (1), en série, dans le cerveau de 11 chiens — dans le but de le réadapter au chien pour le ramener au stade de virus des rues — et reporté ensuite sur lapin, ce même virus fixe ne montre aucune tendance à récupérer les caractères perdus par sa mutation.

Inoculé en série dans le cerveau de la souris — espèce ani-

(1) Ch. NICOLLE et Et. BURNET. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 1924, p. 366.

male éminemment propice au développement des corps de Negri — le virus fixe garde ses caractéristiques et ne produit plus de corps de Negri dans la corne d'Ammon, ce qui a déterminé Levaditi, Schoen et Metzger (1) à supposer que la mutation qui aboutit au virus fixe est un phénomène irréversible ou, tout au plus, difficilement réversible. Nos expériences sur ce problème ont été plus heureuses que celles de nos devanciers. Nous sommes partis de quelques données établies par nos travaux antérieurs : le virus rabique des rues, introduit dans le cerveau des lapins, se disperse par voie nerveuse centrifuge (2) dans tout l'organisme et engendre le phénomène de septinérite (3), se logeant partout où il y a un neurone ou un filet nerveux ; le virus fixe, introduit par la même voie, se dissémine dans le système nerveux d'une manière plus inconstante (4) que le virus des rues. Si ce dernier provoque constamment la septinérite, c'est parce que, dans la nature, il est habitué à cheminer le long des nerfs (de la morsure vers le névraxe et, ensuite, du névraxe vers la périphérie, ce qui rend, en particulier, la bave virulente). Le virus fixe, entraîné à cultiver dans l'encéphale, perd en partie la propriété de cheminer le long des nerfs ; l'expérience montre, par l'inconstance de la septinérite et par l'innocuité de l'inoculation sous-cutanée (5), son aptitude diminuée à la dissémination nerveuse centrifuge ou centripète. En présence de ces notions, nous avons formulé l'hypothèse suivante : l'adaptation d'un virus à un tissu spécial (encéphale) opère une sélection dans la masse des germes ; comme corollaire, le nombre des germes habitués à cultiver dans les cellules encéphaliques s'enrichit dans le virus fixe, tandis que celui des éléments habitués à cheminer et cultiver dans les troncs nerveux s'appauvrit.

Les neurones du cerveau en général, ceux de la corne d'Ammon en particulier, ne peuvent pas résister à l'action des éléments habitués à cultiver dans l'encéphale (virus fixe), en sorte que les corps de Negri [qui sont, pour nous, une des

(1) LEVADITI, SCHOEN et METZGER. *C. R. Soc. Biol.*, **110**, 1932, p. 366.

(2) S. NICOLAU et I. A. GALLOWAY. *C. R. Soc. Biol.*, **98**, 1928, p. 31.

(3) S. NICOLAU, O. DIMANESCO et I. A. GALLOWAY. *Ces Annales*, **43**, 1929, p. 1-88.

(4) S. NICOLAU et V. SERBANESCO. *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 1928, p. 294.

(5) LEVADITI, S. NICOLAU et SCHOEN. *Ces Annales*, **40**, 1926, p. 973.

formes de résistance de la cellule (1)] n'apparaissent pas. Mais, si dans une souche prédominent les éléments habitués principalement à cheminer et à cultiver dans les nerfs (virus des rues), les neurones encéphaliques lutteront davantage, il y aura formation de corps de Negri, l'incubation de la maladie sera plus longue et l'animal succombera plus tard. Si cette hypothèse est juste, l'entraînement systématique d'un virus fixe sur les nerfs périphériques lui restituera, en partie au moins, la propriété de cultiver et de cheminer dans les nerfs, et en même temps la faculté de provoquer dans les neurones encéphaliques de nombreux corps de Negri, à l'exemple du virus des rues.

Pour vérifier ces prémisses, nous avons fait des expériences. Une couche de virus rabique, passée de cerveau à cerveau sur lapins depuis près de six années dans notre laboratoire, provoquait dans la corne d'Ammon l'apparition de 1 à 4 corpuscules de Negri pour 100 cellules ganglionnaires, d'ailleurs petits et peu oxyphiles. La mort des lapins survenait régulièrement en neuf à onze jours; c'était bien une souche de virus fixe. Néanmoins, comme sa mutation n'était pas trop ancienne, nous l'avons choisie pour prouver, par passage de nerf à nerf, la réversibilité de cette mutation. Nous avons inoculé ce virus dans le nerf sciatique *droit* des lapins; à la mort des animaux, des émulsions faites avec leur sciatique *gauche* servaient à inoculer, toujours dans le sciatique *droit*, d'autres animaux; à la mort de ces derniers, on prélevait à nouveau le sciatique *gauche*, et ainsi de suite. Par ailleurs, les émulsions de sciatique *gauche* étaient inoculées dans le cerveau de lapins de contrôle pour faire le dénombrement des corps de Negri dans la corne d'Ammon.

Deux lignées de passage ont été obtenues, avec beaucoup de peine, puisque, surtout au début de nos expériences, les passages de nerf à nerf s'arrêtaient à cause de la carence septénérivrique du virus fixe. Ces expériences, échelonnées sur près de deux années, nous permettent d'affirmer que la transformation du virus fixe en virus des rues est possible, si l'on en juge par le nombre des corps de Negri qui, dès le quatrième

(1) S. NICOLAU, I. KOPCIAWSKA et M. MATHIS. *C. R. Acad. Sc.*, 1934, p. 288.
Annales de l'Institut Pasteur, t. LIII, n° 4, 1934.

ou le cinquième passage de nerf à nerf, se trouvent dans la corne d'Ammon des lapins de contrôle; or, nous en sommes, dans une lignée, au quinzième passage et, dans l'autre, au onzième passage.

Dans la corne d'Ammon des lapins inoculés sous la dure-mère avec l'émulsion de sciatique gauche (opposé au nerf inoculé), le nombre des corps de Negri aux deuxième, troisième, quatrième et septième passages est respectivement de 11, 62, 17, et de 102 pour 100 neurones dans une lignée, et de 28, de 21, 160 et 92 pour 100 neurones dans l'autre. Ajoutons encore que, dans les ganglions spinaux des animaux des troisième, cinquième et sixième passages de nerf à nerf, nous avons dénombré, dans une lignée, 209, 208 et 168 corps de Negri pour 100 cellules nerveuses; dans l'autre lignée, 300, 152 et 106 pour le troisième, le quatrième et le huitième passage; or, on sait que le virus fixe ne provoque pratiquement pas la formation des corps de Negri à ce niveau.

Nos expériences, poursuivies depuis la publication des premiers résultats, nous ont conduits à inoculer le virus ainsi redevenu *negrigène* dans le cerveau et dans le sciatique de chiens. Les résultats de ces inoculations nous ont montré également que nous sommes bien arrivés à posséder une variété de virus rabique *negrigène chez le lapin et chez le chien*. Nous pouvons conclure qu'un virus rabique fixe, passé en série de nerf à nerf, sur lapin, pendant près de deux années, a récupéré la propriété, réputée comme caractérisant le virus rabique des rues, de provoquer la formation de corps de Negri dans la corne d'Ammon des animaux inoculés par voie cérébrale; ce résultat prouverait que la mutation d'un virus rabique des rues en virus fixe est réversible.

Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, l'ensemble des lapins ayant servi à ces expériences constitue le *lot c*. On pense bien que les ganglions spinaux des animaux inoculés dans le nerf sciatique, bourrés d'inclusions rabiques, ont formé — nous allons voir dans un instant pour quelles raisons — un matériel de choix pour l'étude des corps de Negri.

TECHNIQUE.

Dès la mort de l'animal, provoquée soit par la paralysie rabique, soit par la saignée totale, on a fait l'autopsie. Le système nerveux, fixé dans le liquide de Duboscq-Brasil-Bouin, coupé à la paraffine, a été coloré par la méthode de Mann modifiée (1) ou avec le colorant de Giemsa, ainsi que nous l'avons mentionné par ailleurs. Les coupes, faites en série, ont été colorées souvent en série, ce qui nous a permis de suivre sur plusieurs coupes du même bloc la même modification pathologique sous plusieurs aspects.

ÉTUDE HISTOLOGIQUE.

Notre étude porte principalement sur la formation des inclusions rabiques dans les neurones des ganglions spinaux, parce que ces neurones sont beaucoup plus grands que les neurones névralgiques et que leurs corps de Nissl (qui jouent un rôle principal dans la formation des corps de Negri) sont beaucoup plus abondants que dans les cellules du névrate ; accessoirement, nous avons étudié les inclusions prenant naissance dans les neurones de l'encéphale et de la moelle.

1^o *Les corps de Negri chez les animaux inoculés dans le nerf sciatique avec notre virus des rues et sacrifiés après un laps de temps déterminé.*

Les premiers corps de Negri typiques font leur apparition dans les neurones des ganglions spinaux le septième jour après l'inoculation. Mais, déjà au bout du troisième jour, on assiste à des modifications morphologiques au niveau des ganglions spinaux de la région lombaire de la moelle ; dans quelques cellules nerveuses de ces ganglions, les corps de Nissl, lesquels à l'état normal sont de taille réduite et dispersés de manière

(1) Les coupes séjournent pendant vingt-quatre heures dans le mélange suivant : 23 cent. cubes solution à 1 p. 100 d'éosine « R. A. L. 225 » + 17 cent. cubes solution à 1 p. 100 bleu de méthyle de Grüber + 50 cent. cubes eau distillée. Sorties du colorant, les coupes sont lavées rapidement à l'alcool absolu, avant de les plonger dans l'alcool sodique : alcool absolu, 30 cent. cubes + 1 cent. cube soude caustique à l'alcool à 1,5 p. 100. Différenciation. Alcool absolu, xylol, baume de Canada ordinaire (acide). Les coupes doivent avoir un aspect bleu ciel.

homogène dans le cytoplasme (fig. 1), s'agglomèrent et s'agglutinent, constituant des formations à affinité basophile plus marquée que d'habitude, et de dimensions plus grandes que les corps de Nissl normaux (fig. 2). En même temps, au pourtour de ces cellules, on constate une légère prolifération des cellules capsulaires et l'apparition de rares cellules d'infiltration interstitielle.

L'animal, sacrifié vingt-quatre heures plus tard, c'est-à-dire *le quatrième jour* après l'inoculation intraspatiale, présente, toujours dans les ganglions spinaux de la région lombaire, les mêmes modifications, mais un peu plus accentuées ; dans quelques neurones, les corps de Nissl apparaissent agglutinés en gros flocons, masses à affinité tinctoriale marquée et de dimensions plus importantes que dans le cas précédent. La disposition de ces masses, à contour irrégulier et mal défini, à l'intérieur du neurone, évoque l'idée de la flocculation d'un colloïde ; pour cette raison, nous croyons que l'expression « *corps de Nissl flocculés* » représente très bien ce phénomène (fig. 3).

Le *cinquième et le sixième jour* après l'inoculation, on assiste au processus suivant : les corps de Nissl, qui se présentaient dans le stade précédent sous forme de flocons, peuvent, à ce moment, ébaucher déjà la forme des corps de Negri ; ils apparaissent avec le contour régulier de la future inclusion. A ce stade, leur affinité tinctoriale diffère de celle des corps de Nissl normaux (fig. 4). Dans le cytoplasme d'autres neurones ganglionnaires, on voit des masses inégales de corps de Nissl agglutinés, à contour tantôt rond, tantôt irrégulier, stades qui succèdent à la flocculation et qui précèdent la formation de corpuscules ronds qui, par leur forme et leur siège, rappellent les corps de Negri bleus.

Ajoutons que, dès ce moment, l'infiltration interstitielle du ganglion spinal s'intensifie au point de pouvoir constituer des zones d'infiltration nodulaire, ébauche des futurs nodules rabiques ; absence de neuronophagie, mais tendance vers ce processus.

Les constatations les plus intéressantes ont été faites chez les animaux sacrifiés *le septième jour* après l'inoculation intraspatiale. A ce moment, de rares neurones contiennent déjà

des corps de Negri typiques ; dans la même cellule, et à côté de ces corps arrivés au stade d'inclusions oxyphiles caractéristiques, on peut voir des inclusions en voie de formation, rondes ou allongées, constituées par des corps de Nissl modifiés, inclusions qui deviennent de plus en plus oxyphiles ; les unes sont petites, bleues (Mann), bleu-rose, d'autres sont plus grandes ; elles empruntent la gamme complète des couleurs allant du bleu caractéristique des corps de Nissl jusqu'au rouge vif des corps de Negri typiques (fig. 6).

Dans d'autres cellules, les masses arrondies de corps de Nissl flokulés commencent à subir une transformation oxyphile qui débute en leur centre et s'étend progressivement vers leur périphérie (fig. 5) ; cette transformation, traduite par le changement de l'affinité tinctoriale, s'opère probablement sous l'influence du virus s'y trouvant et aboutit à la formation des corps de Negri. Certains aspects représentent une autre modalité du même processus : un bloc compact de corps de Nissl flokulés, de forme arrondie, ovaire, ou surtout piriforme ou fusiforme, subit à un de ses pôles cette transformation d'affinité tinctoriale, et le pôle touché se montre oxyphile, rouge, dans les colorations au Mann, en contraste avec le reste de la matière encore bleue (fig. 7). L'envahissement progressif du bloc entier de substance basophile par ce processus de transformation oxyphile aboutit, plus tard, à la formation d'une inclusion rabique typique. Enfin, une dernière modalité de transformation des corps de Nissl en corps de Negri est la suivante : le long d'une masse de corps de Nissl très allongée et revêtant l'aspect fusiforme, ou bien à l'intérieur de masses arrondies de ces corps agglutinés, apparaissent un ou plusieurs points rouges, oxyphiles. La dimension de ces petits corpuscules est d'abord très réduite, ne dépassant pas celles des granulations oxyphiles se trouvant normalement dans les neurones d'animaux normaux ; il ne s'agit toutefois pas, dans notre cas, de ces granulations oxyphiles, superposées aux corps de Nissl à masse et aspect modifiés ; les granulations oxyphiles physiologiques se trouvent toujours en nappes, en grappes volumineuses constituées par une multitude d'éléments, tandis que nos petites formations oxyphiles pathologiques prennent naissance, comme éléments isolés, à l'intérieur même du corps de Nissl modifié

probablement par l'action du germe rabique. Petit à petit, la taille du corpuscule augmente (fig. 14), la substance environnante subissant la transformation oxyophile se dépose sur ce point central ; le corps de Negri prend ainsi naissance ; le petit corpuscule initial constitue le point central de l'inclusion, qui réalise à la coloration au Giemsa l'aspect de *structure interne* de l'inclusion cellulaire.

Le début de tous ces processus a été surpris chez l'animal sacrifié sept jours après l'inoculation intra-sciatique. En même temps, chez le même animal, et toujours dans les ganglions spinaux, nous avons trouvé, à côté d'une infiltration interstitielle intense, des nodules rabiques déjà constitués, et des processus de neuronophagie en pleine activité. Il est à remarquer que, dans le même ganglion spinal, on peut rencontrer des zones plus ou moins lésées, de même qu'à côté de neurones encore intacts on peut voir des phases du processus de « negri-génèse » plus ou moins avancées, allant de la flocculation des corps de Nissl jusqu'à la formation complète du corps de Negri, en passant par les modalités de formation mentionnées plus haut. Tout porte à croire que les germes inoculés dans le tronc nerveux n'arrivent pas en nappe d'épaisseur homogène dans le ganglion correspondant ; les cylindraxes [car nous croyons que c'est par le cylindraxe que les germes se propagent dans leur envahissement descendant (centripète) et descendant (centrifuge)] servant de « rail » à des éléments virulents plus ou moins nombreux et agressifs, les cellules ganglionnaires qui leur correspondent en seront plus ou moins altérées. D'autres cylindraxes enfin, en raison du manque de contact initial avec le germe inoculé, ne sont pas utilisés par les germes comme voie de propagation, et les neurones correspondants n'en sont pas modifiés. Certains éléments virulents arrivent dans les cellules nerveuses, plus tôt, d'autres plus tardivement, ce qui expliquerait les phases différentes du processus rabique dans les neurones. Les cellules non touchées par le processus seraient celles qui correspondent aux cylindraxes non utilisés par la propagation du germe, soit parce qu'elles correspondent à des filets nerveux innervant des territoires plus ou moins éloignés du point d'inoculation, soit parce que, tout en faisant partie du tronc nerveux inoculé, ils ont échappé par hasard au contact du germe.

Dans des stades plus tardifs de la maladie, chez les lapins sacrifiés plus tard (du huitième au douzième jour), le nombre des neurones affectés par le processus rabique, dans le même ganglion, augmente de plus en plus. Il n'y a pas que les cellules ganglionnaires qui constituent l'aboutissant des cylindraxes touchés directement par l'inoculation des germes qui soient lésées, mais déjà presque tous les neurones du même ganglion. Il est bien probable qu'une fois le germe arrivé dans ce segment du système nerveux périphérique les éléments virulents pullulent et infectent, au bout d'un certain temps, tout le tissu nerveux environnant. Cette manière de voir est corroborée par les résultats des expériences que nous avons entreprises sur la dissémination du virus rabique des rues introduit dans un nerf périphérique. En effet, nous avons constaté que le germe inoculé dans le scialique est retrouvé déjà au bout de sept jours *et en même temps, et dans le cerveau et dans le nerf sciatique opposé*.

Il est probable que tout en gagnant le cerveau par des voies cylindraxiles préformées, les germes, en pullulant, gagnent du terrain de proche en proche, en tache d'huile, par une espèce d'imbibition et s'étendent dans tout le névraxe, sans nécessiter de voies nerveuses préformées, sans « rail » ; le passage du virus de la moitié droite à la moitié gauche de la moelle, puis sa présence dans le ganglion et dans le nerf opposé à celui inoculé, serait dû à ces mécanismes. Le cheminement des germes rabiques, en partant du ganglion spinal correspondant au tronc nerveux inoculé, et en allant jusqu'au ganglion similaire du côté opposé de la moelle, nécessite un certain temps. Ce laps de temps est inscrit sur les coupes : chez les lapins sacrifiés sept et huit jours après l'inoculation intra-sciatique, le ganglion le premier touché par le virus dans sa marche *ascendante* a des altérations histologiques et des processus de « négriogénèse » plus avancés que le ganglion correspondant du côté opposé, où le virus arrivé plus tard n'a pas encore eu le temps, dans sa marche *descendante* (septinévrétique), d'engendrer des modifications de même intensité. Cette différence d'intensité de lésions entre les ganglions spinaux du territoire inoculé et ceux, similaires, du côté opposé de la moelle, très nette chez les animaux sacrifiés au bout de sept à dix jours après l'inoculation, s'atténue par la suite : chez les animaux morts au bout

de quinze jours, elle devient pratiquement inexistante; de même, les différences d'intensité des altérations trouvées dans les ganglions de la région lombaire (inoculation sciatique) et celles de ganglions des étages supérieurs de la moelle. Mais revenons à la *formation des corps de Negri*:

Dans les ganglions spinaux des animaux sacrifiés *le huitième, le neuvième et le dixième jour*, les phénomènes intracytoplasmiques qui marquent la formation des corps de Negri sont plus marqués que chez les lapins sacrifiés plus tôt. Des plaques de corps de Nissl laissent voir, à leur intérieur, plusieurs points de transformation oxyophile (fig. 15). Dans certains neurones, de nombreux corps de Nissl modifiés subissent graduellement cette transformation (fig. 8), et sur les préparations colorées au Mann on voit des ébauches de corps de Negri dont les nuances de couleur varient du bleu pâle au rose, ou rouge pâle, et jusqu'au rouge franc caractéristique de l'inclusion achevée (fig. 8). Dans d'autres neurones, les masses agglutinées de corps de Nissl modifiés subissent la dégénérescence oxyophile en de nombreux points. Les multiples corpuscules, ainsi formés, peuvent, par un processus progressif de dégénérescence de la masse où ils ont pris naissance sous l'action des germes, se grouper à l'intérieur d'une gangue commune, constituant ainsi une inclusion à structure interne complexe et variée. Dans d'autres cas, les multiples points corpusculaires rouges, prenant naissance dans la masse des corps de Nissl transformés, ne fusionnent pas, et, si une gangue commune les emprisonne, la formation ainsi constituée présente l'aspect d'un sac rempli de grains (fig. 9 et 10). Cette gangue commune, la paroi du sac, est parfois bien colorée, parfois colorée très faiblement, voire même inexistante; les grains de ce sac peuvent être bacilliformes, cocciformes; leur dimension, toujours réduite, peut varier dans des limites assez étroites; la surface que ces amas de petits corpuscules occupent peut être circulaire, ovaire, fusiforme, ainsi que l'était celle des corps de Nissl modifiés leur ayant donné naissance. Nous avons décrit et figuré des formations analogues à l'occasion d'un travail récent sur la rage autochtone de l'A. O. F. (1).

(1) S. NICOLAU, C. MATHIS et VAL. CONSTANTINESCO, *Ces Annales*, 50, 1933,
p. 778-839.

Au delà du dixième jour, les lésions trouvées dans les ganglions spinaux des lapins inoculés dans le nerf sciatique sont celles de rage classique. Il est quand même important de mentionner, qu'à côté des cellules nerveuses renfermant des corps de Negri arrivés à leur stade final de développement, on voit des neurones contenant dans leur cytoplasme des ébauches de formation d'inclusions ou des inclusions dont le développement n'est pas terminé. L'explication de ce fait a été donnée plus haut.

2^o Les corps de Negri chez les animaux inoculés dans le nerf sciatique et morts entre treize et vingt-cinq jours après l'inoculation.

La première partie de notre étude étant terminée, nous l'avons complétée par l'examen histologique d'un grand nombre de ganglions spinaux provenant de lapins morts de la rage des rues conférée par inoculation dans le sciatique. Dans l'ensemble, les constatations faites sur ce matériel confirment pleinement celles relatées plus haut. Mais, étant donnée l'action prolongée des germes sur les neurones, la moisson de beaux aspects histologiques a été plus riche dans ce dernier matériel. De manière générale, nous pouvons affirmer que, même chez l'animal mort tardivement (au bout de vingt-cinq jours après l'introduction du virus dans le tronc nerveux), tout comme chez ceux sacrifiés de sept à dix jours après l'inoculation par cette même voie, on peut constater dans les ganglions spinaux toutes les phases de la « negrigénèse » : agglutination et flocculation des corps de Nissl, régularisation des contours de ces masses flocculées qui prennent ainsi la silhouette mais non pas encore l'affinité tinctoriale des inclusions, leur dégénérescence oxyophile avec les modalités relatées dans la première partie de ce travail, dégénérescence accomplie probablement sous l'action des germes, le tout aboutissant à la formation des corps de Negri caractéristiques (fig. 21 et 22). Quelques aspects particuliers de la formation de ces inclusions méritent encore d'être signalés. Ainsi le suivant : dans certains neurones, et vraisemblablement sous l'action du virus, les corps de Nissl disparaissent du pourtour du noyau, et, flocculés, s'agglomèrent à la périphérie de la cellule nerveuse (chromatolyse périnucléaire). Dans ce cas, c'est précisément au sein de ces masses de corps

de Nissl refoulées à la périphéries du neurone que débute et évolue le processus qui aboutit à la formation de corps de Negri. Les figures 17 et 18 donnent l'illustration de ce fait. Dans d'autres neurones, les masses de corps de Nissl agglomérées à un pôle de la cellule ont subi, sous l'action des germes, les transformations aboutissant aux inclusions (fig. 12); au sein de la même cellule, dans les autres corps de Nissl n'ayant pas pris part à la constitution de ces inclusions et se trouvant disposés en lanières fusiformes et ondulées (fig. 12 et 16), des petits points rouges apparaissent, point de départ pour des inclusions en voie de formation. Sur d'autres coupes encore (fig. 13, 14, 15, 19), on voit des stades différents de transformation des corps de Nissl tendant vers la formation de corps de Negri.

Souvent, dans la même cellule nerveuse, on voit à côté de corps de Negri arrivés à leur *maturité* des inclusions à peine ébauchées, en voie de formation (fig. 12). S'agit-il d'infections successives du même neurone par diverses poussées de germes envahisseurs? Nous sommes tentés de le croire. La présence de cellules en état très accentué de dégénérescence, de cellules en désintégration morphologique, de cellules en nécrobiose avancée, mais renfermant des corps de Negri constitués, n'est pas rare; de même qu'il n'est pas rare de trouver des corps de Negri libres, ou entourés de vagues restes d'un cytoplasme à peine reconnaissable. Or, pour nous, ainsi que nous l'avons affirmé à plusieurs reprises dans des travaux antérieurs, l'inclusion, en l'espèce le corps de Negri, ne représente autre chose que la défense de la cellule contre le germe qui l'envahit; le virus est emprisonné dans une gangue oxyophile (à l'exemple de la formation d'une perle) dont la matière initiale de construction est fournie — ainsi que nos observations tendent à le prouver — par les corps de Nissl (1). Contre une vague d'assaut

(1) Nos résultats corroborent, en partie, ceux obtenus par des méthodes différentes par Cowell et Danks (*Amer. J. of Path.*, 8, 1932, p. 557). Ces auteurs font d'abord des réactions tinctoriales sur des coupes de corne d'Ammon provenant de singes et de lapins morts après inoculation de virus rabique des rues. Entre autres résultats, ils mentionnent que « les plus jeunes formes de corps de Negri apparaissent dans des blocs de substance de Nissl. » Après avoir utilisé la méthode d'incinération des coupes, ils arrivent à conclure que les corps de Negri « sont probablement formés par la substance basophile altérée et provenant des corps de Nissl, à laquelle s'ajoute du matériel basophile d'origine nucléaire ». Les auteurs rejettent complètement

des germes, la cellule peut se défendre en les emprisonnant dans des inclusions ; une autre vague de virus arrivant, la cellule ne peut plus lutter, son noyau dégénère, le neurone meurt ; la neuro-nécrobiose a lieu, la neuronophagie par la suite, le corps de la cellule, fragmenté, est englobé dans des macrophages ; le nodule rabique se forme, et le corps de Negri est retrouvable soit libre, soit entouré de débris du neurone mort.

Parallèlement à l'étude de la « negrigénèse » dans les neurones des ganglions spinaux, nous avons étudié le même phénomène dans les cellules de la moelle et de l'encéphale. Nous pouvons affirmer qu'il est de beaucoup plus difficile de suivre les phases successives de la formation des corps de Negri dans le névraxe, que dans les ganglions spinaux. Pourtant, les cellules ganglionnaires des noyaux optiques basaux nous ont donné parfois des images en certains points comparables à celles trouvées dans les ganglions spinaux. Nous y avons trouvé, pour la première fois, le huitième jour après l'inoculation du virus dans le tronc sciatique, des ébauches de corps de Negri, à contours réguliers (plaques arrondies de corps de Nissl floclés et modifiés), et à affinité légèrement oxyphile ; ainsi que dans les transformations analogues observées au niveau des ganglions spinaux, cette affinité tinctoriale était plus marquée au centre de la formation et presque inexiste à sa périphérie. Les phases successives aboutissant à la formation des corps de Negri au niveau du noyau optique basal [zone élective pour la formation des corps de Negri (1, 2)], plus marquées chez l'animal sacrifié les neuvième, dixième, onzième et douzième jours, n'aboutissent pourtant que plus tard à la formation des corps de Negri typiques. Cette même constatation est valable également pour la corne d'Ammon des animaux inoculés dans le sciatique.

Sur la morphologie des corps de Negri arrivés au stade

l'hypothèse microsporidienne du virus rabique. Ajoutons que Goodpasture (1925) avait soutenu que dans la constitution des corps de Negri entreraient pour une partie les neurofibrilles et les mitochondries ; Acton et Harvey (1911) croyaient que du matériel provenant du nucléole serait utilisé par la cellule pour construire l'inclusion ; Cowdry, dans un article publié dans le livre de Rivers, avait même suggéré l'idée que la substance des corps de Nissl contribuerait à la formation des corps de Negri.

(1) S. NICOLAU et L. KOPCIOWSKA. *C. R. Acad. Sc.*, **194**, 1933, p. 1865.

(2) S. NICOLAU et L. KOPCIOWSKA. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1933, p. 445.

« adulte » de leur évolution, nous n'insisterons pas; de nombreux auteurs ont décrit la structure de ces inclusions. Mais nous voulons répéter de manière succincte l'interprétation morphogénétique que nous leur donnons. Le virus arrive dans la cellule; la première manifestation de défense de celle-ci est le groupement et la flocculation des corps de Nissl. L'activité des germes change ces blocs irréguliers des corps de Nissl en plaques rondes, ovalaires, fusiformes, à contours réguliers, bien définis; probablement englués dans ces blocs de substance colloïdale condensée, les germes, par leur action, font subir au colloïde une dégénérescence qui se traduit par le changement d'affinité tinctoriale, et les premiers points rouges apparaissent dans les futures inclusions. La substance qui constituait à l'état normal les corps de Nissl, transformée par l'activité des germes, se dépose autour du ou des germes, en autant de points concentriques de superposition qu'il y a de foyers ou de colonies virulentes; celles-ci constitueront plus tard les points chromatiques qui définissent la structure interne des corps de Negri. A l'exemple de la *perle* sécrétée par le mollusque autour de la particule irritante ayant pénétré dans son corps, la cellule déposera autour des germes des enveloppes multiples fabriquées avec le matériel pris sur les corps de Nissl; et ainsi les germes seront emprisonnés, éliminés de la circulation, leur activité sera endiguée. Cette manière d'interpréter le processus de « negrigénèse » est corroborée par le fait suivant: il nous a été donné de constater la présence de nombreux corps de Negri chez des animaux inoculés avec la rage, morts tardivement de cette maladie et dont le système nerveux ne contenait plus de virus vivant capable de transmettre l'infection (1).

Vu ainsi, le corps de Negri serait l'expression de la victoire de la cellule contre le virus rabique. Le fait qu'en général les inclusions existent dans des cellules dont l'intégrité morphologique et tinctoriale est exacte plaide aussi pour cette interprétation.

Voici encore d'autres arguments: de nombreux neurones peuvent se défendre contre le virus rabique des rues, virus entraîné à cheminer et à pulluler dans les troncs nerveux;

(1) V. NICOLAU, C. MATHIS et V. CONSTANTINESCO, *loc. cit.*

l'expression morphologique de cette défense est la formation de corps de Negri ; la mort des animaux survient tard, et c'est précisément par cette résistance qu'elle est retardée. Contre le virus rabique fixe, virus entraîné à cultiver dans l'encéphale, les neurones du cerveau ne peuvent pas résister aussi bien, de sorte que les corps de Negri (forme de résistance de la cellule) ne peuvent pas se constituer aussi aisément ; l'animal meurt vite, les lésions destructives des cellules nerveuses (qui n'ont pas réussi à endiguer l'activité du virus par la formation des inclusions) sont intenses.

Quelles sont les cellules nerveuses les plus aptes à réagir contre le virus rabique par la formation des inclusions ? Ce sont précisément des neurones ayant l'aptitude de se défendre de par leur fonctionnement physiologique qui leur commande des relations avec l'extérieur : la corne d'Ammon (olfaction), les noyaux optiques basaux, les ganglions spinaux. Par contre, les noyaux bulbares, centre du système nerveux végétatif, ayant avec le milieu extérieur infiniment moins de relations, n'ont pas l'habitude de se défendre contre des facteurs venus de dehors, et, dès l'atteinte du germe rabique, incapables de lutter par la formation d'inclusions, subissent la dégénérescence suivie de la mort de la cellule. Une autre particularité, celle de la richesse en corps de Nissl, préside également à la formation des inclusions rabiques ; dans l'encéphale, le noyau optique basal, qui est constitué par des neurones très gros et riches en corps de Nissl, est la vraie zone élective pour la recherche des corps de Negri ; la corne d'Ammon vient après cette zone, dans l'ordre de richesse en corps de Negri ; enfin, après l'inoculation dans un tronc nerveux, les choses se passent dans les ganglions spinaux comme dans les deux régions signalées plus haut quand l'inoculation a été sous-dure-mérienne. Si nous avons préféré, pour notre travail, nous adresser aux cellules nerveuses des ganglions spinaux, c'est parce qu'elles sont plus riches en corps de Nissl — dont le matériel est utilisé pour la formation des inclusions — parce qu'elles sont entraînées à lutter contre les facteurs extérieurs, et enfin, parce que leurs grandes dimensions rendent, chez elles, les phénomènes de negrigénèse plus aisément observables.

CONCLUSIONS.

Chez le lapin inoculé avec un virus rabique des rues dans le nerf sciatique, les corps de Negri typiques apparaissent dans les neurones des ganglions spinaux correspondant au tronc nerveux inoculé dès le septième jour. Chez les animaux sacrifiés avant cette date (troisième, quatrième, cinquième et sixième jours), on constate dans ces mêmes neurones des modifications morphologiques qui précèdent la formation des inclusions caractéristiques. Les phases de la NEGRIGÉNÈSE se succèdent de la manière suivante : 1^o agglutination des corps de Nissl (fig. 2); 2^o flocculation intense de ces corps agglutinés, qui forment des masses plus ou moins chromatophiles, de dimensions très variables et à contours irréguliers (fig. 3); 3^o régularisation et arrondissement du contour de ces masses; leur forme devient semblable aux formes des futures inclusions, leur affinité tinctoriale reste d'abord légèrement basophile (fig. 4); 4^o sous l'influence des germes, ces masses arrondies subissent une transformation oxyophile, et, par plusieurs modalités, finissent par constituer des corps de Negri. Ces modalités sont : a), apparition au centre du bloc de substance de Nissl, d'une petite plage plus ou moins rouge, qui gagne petit à petit le bloc entier (fig. 5); b) les petites masses deviennent d'embrée plus ou moins oxyphiles (fig. 6); c) apparition d'un ou plusieurs points oxyphiles au sein du bloc de corps de Nissl (fig. 7, 13, 14, 15, 16); la dimension de ces tout petits corpuscules rouges augmente par un effet de superposition, sur leur pourtour, de matière colloïdale constituant le bloc de corps de Nissl modifiés, matière rendue oxyophile par l'action des germes. On obtient ainsi un corps de Negri avec un point central; quand plusieurs corpuscules à la fois constituent les points de départ d'une inclusion, le corps de Negri qui en résulte renferme plusieurs points chromatiques dans sa « structure interne »; d) des points rouges, multiples, apparaissent dans les masses agglomérées de corps de Nissl modifiés; ces masses sont transformées petit à petit en amas de petits corpuscules oxyphiles. Si ces corpuscules sont enfermés dans une gangue commune, ils constituent des corps de Negri ressemblant à des « sacs remplis de grains »; si cette gangue se

colore mal ou si elle semble inexisteante, on assiste à la formation des amas de petits corpuscules oxyphiles occupant l'emplacement de l'ancien bloc de corps de Nissl modifiés (fig. 9, 10 et 11).

En général, les neurones qui renferment de beaux ou de nombreux corps de Negri n'ont plus, dans leur cytoplasme, des corps de Nissl, le matériel qui constitue ces derniers, transformé par l'action des germes, ayant servi à la formation de l'inclusion. *A l'intérieur des neurones, possédant des corps de Nissl en quantité abondante, prennent naissance les plus beaux corps de Negri (cellules nerveuses des ganglions spinaux, neurones des noyaux optiques basaux et de la corne d'Ammon).*

Les corps de Negri sont des formations de défense de la cellule; quand les inclusions apparaissent dans la cellule, celle-ci garde presque toujours son intégrité morphologique et tinctoriale; si elle n'est pas apte à réagir par la formation d'inclusions, les germes l'envaissent complètement, sa dégénérescence et la nécrobiose s'ensuivent.

Nous sommes portés à croire que certaines cellules nerveuses (ganglions spinaux, noyaux optiques basaux, corne d'Ammon) sont plus aptes que d'autres à réagir contre le germe rabique par la formation d'inclusions, en raison de leur fonctionnement physiologique, qui leur commande des relations avec l'extérieur; par contre, les neurones des noyaux bulbares, centres du système nerveux végétatif, ayant avec le milieu extérieur infiniment moins de relations, n'ont pas l'habitude de se défendre contre des facteurs venus de dehors, et, dès l'atteinte du germe rabique, incapables de réagir par la formation d'inclusions, subissent la dégénérescence suivie de la mort des cellules.

Légende de la planche II.

Cellules nerveuses des ganglions spinaux provenant de lapins inoculés dans le nerf sciatique avec du virus rabique des rues; étapes du phénomène de « negrigénèse » aboutissant dans les deux dernières cellules (fig. 21 et 22) à la formation des corps de Negri caractéristiques.

Fig. 1. — Neurone normal, à corps de Nissl disséminés de manière régulière dans le cytoplasme.

Fig. 2. — Corps de Nissl agglutinés, réalisant dans le cytoplasme des formations basophiles plus marquées et plus volumineuses que d'habitude.

FIG. 3. — Flocculation des corps de Nissl.

FIG. 4. — Neurone renfermant des corps de Nissl dont la structure et l'aspect sont déjà modifiés par l'activité des germes rabiques; en effet, ils apparaissent arrondis, à contours bien définis, prenant ainsi la forme d'inclusions. L'affinité tinctoriale n'est pas encore modifiée.

FIG. 5. — Neurone dont le noyau n'est pas dans la coupe; les corps de Nissl, à l'état de masses volumineuses, commencent à subir en leur centre la transformation oxyophile.

FIG. 6. — Cellule nerveuse renfermant dans son cytoplasme de nombreuses inclusions en voie de formation, constituées par des corps de Nissl modifiés, inclusions dont l'affinité tinctoriale emprunte la gamme de couleurs allant du bleu caractéristique des corps de Nissl jusqu'au rouge vif des corps de Negri typiques.

FIG. 7. — Des masses de corps de Nissl modifiés acquièrent à l'un de leurs pôles une affinité oxyophile qui contraste avec le reste de la formation; on voit d'autres formations subissant en plusieurs points de leur masse la transformation oxyophile.

FIG. 8. — Corps de Negri dans plusieurs phases de leur évolution, à l'intérieur du cytoplasme du même neurone.

FIG. 9 et 10. — Masses chromatiques dont la surface est parsemée de multiples points acidophiles. On remarque dans la figure 9 des restes de corps de Nissl surchargés par les corpuscules rouges; dans la figure 10, l'affinité oxyophile de ces dernières formations est peu marquée.

FIG. 11. — Toutes les masses de corps de Nissl sont transformées en points rouges et présentent l'aspect de *sacs à grains*.

FIG. 12. — A un pôle de cette cellule nerveuse, on voit des corps de Negri constitués; dans le reste du cytoplasme, des corps de Nissl transformés en lanières ondulées, présentent des points rouges, points de départ des inclusions en voie de formation.

FIG. 13 et 14. — Stades différents de transformation, sous l'action des germes, de corps de Nissl en corps de Negri.

FIG. 15. — Dans les masses de corps de Nissl modifiés, apparaissent des points rouges; au sein d'une formation plus volumineuse, on voit 4 points rouges oxyphiles. Dans un stade ultérieur de leur évolution, les 4 points augmenteront de volume, s'agglutineront, toute la masse chromatique qui les renferme deviendra oxyophile, et la structure interne du corps de Negri qui en résultera rappellera ces 4 points de départ de la formation de l'inclusion.

FIG. 16. — Cellule renfermant, en plus de deux corps de Negri arrivés au stade d'inclusions caractéristiques, des corps de Nissl en forme de lanières fusiformes qui présentent de multiples points rouges, stades dans l'évolution des futures inclusions.

FIG. 17 et 18. — Corps de Negri prenant naissance aux dépens de masses de corps de Nissl accumulées à la périphérie des neurones. Une partie de la substance chromatique des corps de Nissl est déjà transformée — sous l'action du virus — en corps de Negri; une autre partie a subi une transformation oxyophile poussiéreuse non corpusculaire.

ÉTUDE SUR LA MORPHOGÉNÈSE DES CORPS DE NEGRI 437

FIG. 19. — A la périphérie de la cellule, on voit des corps de Negri ayant pris naissance au sein des corpuscules de Nissl agglomérés; dans le reste du cytoplasme, petits corpuscules d'un rouge pâle.

FIG. 20. — Corps de Negri pauvres en matière oxyophile.

FIG. 21 et 22. — Dans les deux neurones, corps de Negri caractéristiques, arrivés à l'état de « maturité » complète. Le cytoplasme des cellules ne renferme plus de corps de Nissl dont la matière, transformée par l'action des germes, a servi à édifier ces inclusions oxyphiles.

MORPHOLOGIE ET ÉVOLUTION DU MICROBE DE L'AGALAXIE CONTAGIEUSE DES OVINS ET DES CAPRINS DANS LES MILIEUX NUTRITIFS

par le professeur NOWAK et Iwo LOMINSKI.

Bridré et Donatien ont découvert en 1925 l'agent pathogène de l'agalaxie, et ils l'ont décrit comme un microbe très menu, filtrant, mais visible, et de formes variées. Les éléments d'aspect granuleux de ce microbe observés par les auteurs à l'ultramicroscope donnaient l'impression de petits cocci réunis et inclus dans une gangue. Les auteurs ajoutent qu'on y retrouve tous les caractères morphologiques observés chez le microbe de la péripneumonie contagieuse des bovidés.

Bridré et Donatien recommandent comme la plus efficace pour l'examen du microbe de l'agalaxie la méthode de surcoloration employée avec succès pour mettre en évidence le microbe de la péripneumonie, bien qu'ils eussent obtenu aussi des résultats satisfaisants avec une simple coloration au colorant de Giemsa. Ils donnent dans leur travail des explications détaillées sur la filtrabilité du microbe, sur sa culture, etc. (1).

Depuis, on a entrepris de plusieurs côtés des recherches sur le microbe de la péripneumonie, qui ont beaucoup contribué à la connaissance de ce germe énigmatique et indiqué la voie qu'il faut suivre pour l'étudier.

Pour l'étude de microbes tels que celui de la péripneumonie et de l'agalaxie, la microphotographie au grossissement maximum est un procédé qui fournit non seulement des documents scientifiques irrécusables, mais qui permet aussi de mettre en évidence les détails les plus menus des préparations microscopiques, à la condition que les microphotographies soient faites directement au plus fort grossissement. Les microphotographies faites à des grossissements médiocres, puis agrandies,

(1) Le microbe de l'agalaxie contagieuse du mouton et de la chèvre par J. Bridré et A. Donatien. Ces *Annales*, 39, 1925, page 926.

n'ont, comme moyen de travail et comme document scientifique, qu'une valeur très limitée.

L'étude des microbes de la péripneumonie et de l'agalaxie présente des difficultés spéciales non seulement à cause de leurs petites dimensions, mais surtout en raison de leur résistance extraordinaire vis-à-vis des colorants. La méthode qui s'y prête le mieux est la surcoloration énergique. Les microbes de la péripneumonie et de l'agalaxie se colorent très difficilement et se décolorent avec une extrême facilité, en quoi ils diffèrent des éléments comme le bacille de Koch ou les spores. Même un lavage à l'eau très prolongé, en vue d'éliminer le colorant superflu, peut faire disparaître aussi le colorant des corps microbiens. Quelquefois, un seul lavage d'une préparation par le xylène non exactement neutre, pour entraîner l'essence de cèdre, suffit pour faire disparaître en même temps la coloration des microbes.

Un autre obstacle, qui rend très difficile l'obtention de préparations satisfaisantes se prêtant à la microphotographie, est l'extrême propension des méthodes de surcoloration à donner des précipitations qui peuvent facilement causer des erreurs. Le danger des précipitations est d'autant plus grand que le milieu nutritif des cultures contient un pourcentage considérable de sérum. On peut éviter cet inconvénient en centrifugeant la culture et en lavant le sédiment à l'eau physiologique pour le débarrasser du sérum. Nous avons toujours examiné parallèlement des préparations provenant du culot de centrifugation et de la culture non centrifugée, en prélevant le matériel avec une pipette en diverses couches de la culture.

On observe souvent la présence d'un voile à la surface des cultures du microbe de l'agalaxie âgées de quatre à six jours, en bouillon contenant de 8 à 15 p. 100 de sérum. L'apparition de ce voile est en rapport avec la rapidité du développement et avec l'abondance de la culture. Il se présente comme une fine membrane lisse rappelant les membranes lipoïdiques, qui apparaissent sur la bile ou sur le sérum recueilli depuis plus longtemps. L'examen microscopique n'y décèle qu'une quantité relativement petite de microbes, souvent beaucoup plus petite que celle du milieu même; ces microbes proviennent probablement du milieu nutritif qui adhère toujours au voile.

prélevé pour l'examen. Leur morphologie ne diffère en rien de celle des germes dans la profondeur. Le voile n'apparaît pas si le sérum, avant d'être ajouté au milieu nutritif, a été conservé assez longtemps, de quatre à huit mois, puis décanté et soigneusement filtré. Dans un milieu contenant un tel sérum, le microbe de l'agalaxie se développe très bien, mais le voile n'apparaît pas.

Le bouillon nutritif, stérilisé et additionné de 15 à 20 p. 100 de sérum, puis conservé à l'étuve à 37°, mais non ensemencé, se recouvre également d'un voile qui se dissout facilement dans l'éther et le chloroforme, comme les corps lipoïdiques. Le voile des cultures des microbes de l'agalaxie se comporte de la même façon. On peut obtenir aussi la formation du voile sur bouillon stérile additionné de 8 à 15 p. 100 de sérum, quand on laisse le milieu s'évaporer.

Si l'apparition du voile dépendait uniquement de la multiplication du microbe de l'agalaxie dans la culture, il y apparaîtrait constamment, ce qui n'est pas le cas, et ne se formerait pas, comme nous l'avons vu plus haut, dans certaines conditions, sur les milieux nutritifs stériles.

Il en résulte que le voile est un produit chimique du milieu nutritif contenant du sérum, dont la formation peut être provoquée ou accélérée par des altérations du milieu qu'entraîne le développement des microbes de l'agalaxie. C'est donc un phénomène hétérogène, qui n'a rien de commun avec l'évolution de ces germes.

Les précédentes constatations commandent une grande circonspection dans l'examen des cultures du microbe de l'agalaxie, de grandes précautions dans la classification et la définition des images microscopiques respectives, une grande prudence dans l'appréciation de leur signification et de leur rôle dans le cycle évolutif des éléments microbiens.

En examinant les préparations faites des cultures du microbe de l'agalaxie en bouillon-sérum, peu de temps après l'ensemencement avec un filtrat sur bougie Chamberland L1 bis ou L2, il arrive qu'on y trouve, avant que le liquide ait commencé à se troubler, des microbes déjà en assez grand nombre et en général uniformes. Il s'agit de petits grumeaux protoplasmiques ronds ou plus ou moins oblongs, quelquefois accouplés

comme des diplococques, ou réunis en petites chaînettes. On y peut observer également des éléments haltérisiformes ou en forme de massue, rappelant les bacilles diphthéroïdes, comme le démontre la photographie n° 1. La coloration de ces éléments est uniforme, de même que son intensité. Or, à aucun autre stade du développement de la culture, on n'observe une telle uniformité des germes de l'agalaxie, et même pas toujours à ce stade initial. Il nous paraît pratiquement utile et théoriquement justifié de nommer ces grumeaux : *corpuscules élémentaires ou primitifs*. Ces corpuscules sont élémentaires et primitifs, puisqu'ils apparaissent dans les cultures ensemencées avec des filtrats comme les premières formes et parce que leur forme est, en général, la plus primitive, la plus élémentaire : celle du grumeau rond ou à peu près rond.

Si nous observions uniquement ces formes dans les cultures du microbe de l'agalaxie, nous n'hésiterions pas à les considérer comme des bactéries en forme de cocci. Mais déjà l'image que nous présente la microphotographie n° 2 est bien différente. Nous y voyons des corpuscules fortement colorés et semblables morphologiquement à ceux de la photographie n° 1, mais ils sont peu nombreux et disséminés dans une masse de grumeaux très faiblement colorés.

Il ne faut pas attribuer une trop grande importance aux différences d'intensité de la coloration. Mais s'il se manifeste dans l'intensité de la coloration une différence telle que nous l'observons sur la photographie n° 2, où *les corpuscules élémentaires* peu nombreux, fortement colorés, sont disséminés sur un fond consistant en *grumeaux protoplasmiques*, d'une coloration beaucoup plus faible que celle des premiers, la supposition semble justifiée que nous sommes en présence de deux substances caractérisées par une affinité tinctoriale différente. La matière plus fortement colorée apparaît sous la forme plus définie de *corpuscules élémentaires*, tandis que l'autre, qui n'est teintée que faiblement, apparaît comme des *grumeaux protoplasmiques* de formes diverses, en général difficiles à déterminer. L'hypothèse de l'existence de deux substances protoplasmiques différentes semble trouver un appui dans le fait que nous retrouvons cette dualité dans tout le cycle évolutif du microbe de l'agalaxie.

La photographie n° 3 montre des *corpuscules* et des *grumeaux* encore plus faiblement colorés que ceux de la photographie précédente. Nous y voyons aussi de petites agglomérations de *grumeaux protoplasmiques* médiocrement colorés autour d'un petit granule incolore. Nous reviendrons plus tard sur l'interprétation de ces formes.

Les photographies n°s 11 et 12 donnent l'image de deux petits anneaux ronds, dont le centre est entouré d'un cercle assez grand et fortement coloré. Ils rappellent les spores bactériennes et les gonidies des champignons, naturellement toutes proportions gardées.

Ces images semblent se répéter sur les photographies n°s 4 et 5. Il y a des anneaux incolores, accompagnés chacun de deux grumeaux assez fortement colorés. Cet aspect rappelle un peu les formes en anneau du parasite de la fièvre tropicale, ressemblance lointaine et purement morphologique. De même, la ressemblance est très frappante avec une spore bactérienne au premier stade de la germination. L'anneau comme forme biologique est presque inconcevable, et ce que nous dénommons ainsi correspond probablement à de petits corpuscules qui prennent très difficilement la couleur, ou qui se décolorent très facilement; enfin, il peut s'agir d'une vacuole.

La photographie n° 8 nous montre un anneau, dont la périphérie est couverte de quelques intumescences bien marquées, qui donnent l'impression d'un bourgeonnement. Les photos n°s 9 et 19 présentent la même image encore plus accentuée.

Le processus de germination des éléments annulaires apparaît avec une grande précision sur les photos n°s 10 et 13. Sur cette dernière, il y a deux anneaux, ou plutôt deux petits globules; un plus haut, légèrement teinté, surtout à son pourtour, qui porte un bourgeon assez long, et un autre globule tout à fait incolore avec un contour à peine marqué, portant deux bourgeons, un plus court uniformément coloré et un autre faiblement teinté contenant à sa base et à son extrémité deux granules plus fortement colorés.

Des images semblables, mais peut-être plus évoluées, sont représentées sur les photos n°s 14, 15 et 16. Les anneaux de

ces deux dernières portent des bourgeons qui semblent consister en granules allongés en chaînettes.

Les figures des photos n°s 17 et 30 se distinguent par les dimensions des anneaux, qui sont plus grandes que celles que nous avons observées jusqu'à présent. De même que les précédents, ces anneaux semblent être encerclés par des granules fortement colorés dont quelques-uns sont allongés en bourgeons.

Les photos n°s 6, 7, 24 et 31 représentent des anneaux en amas, dont les contours portent des bourgeons, et les bourgeons eux-mêmes sont très intensivement colorés.

La combinaison de deux substances, une se colorant faiblement et l'autre fortement, comme dans une certaine mesure, ce que nous avons vu dans les anneaux, peut s'observer également sur les photos n°s 25 et 26, et en bas à droite de la photo n° 14. Sur la première, nous voyons une particule faiblement colorée, comme recouverte d'un bonnet d'un élément plus petit fortement coloré. Sur la photo n° 26, la même figure semble être entourée par des granules assez fortement colorés. Il s'agit peut-être ici d'un autre stade de développement des éléments annulaires décrits plus haut. Ces formes sont assez fréquentes et caractéristiques. Il se pourrait néanmoins que les deux substances formant ces éléments soient seulement en connexion accidentelle.

Les éléments germinatifs que nous avons observés jusqu'à présent (et que par analogie aux phénomènes de germination des gonidies chez les bactéries et chez les champignons nous pensons pouvoir leur assimiler) émanaient toujours d'une substance incolore ou faiblement colorée tandis que les jeunes bourgeons se coloraient fortement. Sur les photos n°s 18, 21 et 22 nous voyons sortir, d'un corpuscule protoplasmique fortement coloré, des bourgeons plus ou moins faiblement teintés. Nous les considérons comme des gonidies d'un autre type, à côté des grandes gonidies en forme d'anneau.

La photo n° 20 contient un corpuscule rond fortement coloré, où s'implante un rameau de faible coloration. Il peut s'agir ici aussi bien d'une prolifération à partir du corpuscule (comme sur les photos n°s 18, 21 et 22) que d'une formation de corpuscule à l'extrémité de l'élément filamenteux, phénomène très fréquent chez les microbes de forme bacillaire et dont l'évo-

lution chez le bacille de Koch a été particulièrement étudiée par l'un de nous (1).

Ayant sous les yeux les images que l'un de nous (2) a décrites pour le microbe de la péripneumonie, nous nous attendions à trouver dans nos préparations des prolongements et des ramifications plus ou moins abondantes au cours du développement ultérieur des petits bourgeons qui en s'accroissant formaient des filaments isolés ou un réseau mycélien. Or rien de pareil n'a été observé pour le microbe de l'agalaxie et sur des milliers d'examens de préparations provenant de différentes souches et colorées selon diverses méthodes nous n'avons jamais réussi à les déceler. Nous pouvons donc constater que le microbe de l'agalaxie, bien qu'on y retrouve des formes en anneau et des éléments germinatifs semblables à ceux du microbe de la péripneumonie, ne forme pas, au rebours de ce dernier, de longs filaments identifiables à des filaments mycéliens. Étant donné que nous avons examiné parallèlement des préparations de cultures centrifugées et non centrifugées, l'objection que les filaments ont été détruits par la force centrifuge ne peut être retenue.

Comme nous le verrons plus loin, on trouve dans les cultures du microbe de l'agalaxie des éléments qui pourraient simuler des filaments mycéliens, mais qui, en réalité, n'ont rien de commun avec un vrai mycélium. Avant de passer à l'étude de ces formes, il nous faut examiner quelques photos.

Sur les photos n°s 33, 34, 35 et 36, nous observons de petits corpuscules et des grumeaux plus ou moins amorphes, fortement colorés et des brins d'une matière faiblement teintée.

Cette dualité tinctoriale de la substance protoplasmique du microbe de l'agalaxie apparaît très nettement sur la photo n° 32. On y voit des corpuscules et des granules reliés par une substance peu colorée ou tout à fait incolore.

La photo n° 37 nous offre l'image d'une ramification. En l'examinant attentivement, nous voyons qu'elle consiste en réalité en petits corpuscules disposés en chaînettes et unis par une substance, semble-t-il, muqueuse, colorée aussi faiblement que les corpuscules mêmes. Cette sorte de disposition des cor-

(1) LOMINSKI (Iwo). *Zentralblatt f. Bakteriologie*, 1. Abt. O., 128, 1933, p. 276.

(2) NOWAK (Julien). Ces *Annales*, 43, 1929, p. 1330.

puscules se présente très nettement sur les photos n°s 27, 28, 29, 38, 39 et 40. Sur la photo n° 27, les corpuscules sont très rapprochés l'un de l'autre et on ne voit que très peu de substance unissante ; celle-ci apparaît par contre sur les autres photographies, en plus grande quantité et au premier plan. Nous y voyons de longs filaments de substance muqueuse dans laquelle sont enfermés les corpuscules élémentaires, relativement en petit nombre. Nous pouvons y observer aussi des ramifications. Celles-ci sont nombreuses sur les photographies n°s 41, 42, 43 et 44. C'est toujours la même substance qui unit les granules rangés en chaînettes, qui par la suite offrent l'aspect de véritables ramifications.

Comment ces ramifications se forment-elles ? Le mode de multiplication le plus important est probablement la division directe ; or, nous pouvons, en nous fondant sur les images microscopiques, accepter que, très souvent, sinon en général, la division s'accomplit dans une sorte de gangue, dont les microbes sont entourés, et qu'elle se fait dans une seule direction, de sorte que les corpuscules se disposent en petites chaînettes. Mais il peut arriver qu'un élément d'une telle chaînette pullule en se divisant dans une direction plus ou moins perpendiculaire à celle-ci, ce qui donne l'image d'une ramification.

Les photos n°s 45, 46 et 47 nous montrent les divers aspects que les chaînettes peuvent adopter. Elles apparaissent tantôt comme des spirochètes à côté desquels on peut observer des filaments ondulés, arqués, repliés, etc.

La gangue forme non seulement des filaments, comme nous l'avons mentionné, mais elle forme aussi de gros amas dans lesquels sont plongés les corpuscules protoplasmiques. Les photos n°s 48 et 52 montrent des amas de gros corpuscules et grumeaux protoplasmiques et quelques éléments annulaires. Les corpuscules et les grumeaux, qui sont représentés sur ces photos, ainsi que sur la photo n° 53, nous frappent par leurs grandes dimensions et leur coloration très intense.

Les photos n°s 55 et 56 nous montrent des éléments en forme de cocci isolés ou réunis en petits amas. L'aspect de ces éléments est bien différent de celui des éléments semblables représentés sur la photo n° 1. Ici, ils font plutôt l'impression

de petites gouttelettes d'une substance semi-liquide, épaisse, que de corps solides tels que les bactéries.

Enfin, il nous faut prendre en considération les photos n°s 49, 57 et 58, et c'est le chapitre du problème le plus difficile. Nous y voyons, outre quelques rares éléments annulaires, des corpuscules et des grumeaux fortement colorés, mais en général plus ou moins amorphes. Il est impossible d'y distinguer une morphologie quelconque. Il n'y a là que des petits grumeaux et des fragments se colorant fortement, des brins et de toutes petites formes qu'on peut supposer mêlées à une autre substance, ne se colorant que très faiblement, qui paraît être muqueuse et complètement amorphe. Nous remettons l'analyse de ces images à la fin de notre étude.

Peut-on se prononcer sur la nature du microbe de l'agalaxie d'après l'examen de nombreuses préparations et microphotographies ?

Avant tout, ce sont les formes bactériennes qui s'imposent à l'investigateur (photos n°s 1, 2, 3, 35 et 36). Nous voyons des formes rappelant les cocci avec leurs figures de division et quelques formes un peu particulières. A côté de ces éléments cocoïdes de forme déterminée, plus ou moins régulière, et dont le protoplasme se colore fortement, nous décelons un autre protoplasme ne se colorant que faiblement, paraissant être semi-liquide, muqueux, qui entoure les éléments principaux morphologiquement plus déterminés, en les unissant en groupes. Cette substance les unit tantôt en groupes ou en amas amorphes (photos n°s 45, 48, 49, 57 et 58); tantôt en chaînettes plus ou moins longues (photos n°s 29, 37, 38, 39, 40, 41, 42 et 43), formes qu'observaient aussi Bridré et Donatien en les décrivant comme unités offrant un aspect granuleux sur toute leur longueur. La nature bactérienne de notre microbe paraît plausible si d'autres images, notamment les formes en anneau (photos n°s 4, 19, 24, 26, 30 et 31), ne compliquaient la question.

Nous avons déjà émis notre avis sur la nature de ces anneaux en les considérant comme des éléments germinatifs. En nous basant sur leur morphologie et sur le fait que ces éléments émettent toujours plusieurs bourgeons, nous pensons, comme nous l'avons déjà dit, pouvoir les assimiler aux *gonidies*. Une

autre explication de ces formes nous paraît difficile. Nous pouvons donc dire qu'un des chainons du cycle évolutif du microbe de l'agalaxie dans les cultures en bouillon-sérum est représenté par des *gonidies*. Des formes analogues, très fréquentes chez les champignons, ont été également retrouvées chez les bactéries par maints auteurs, surtout par Löhnis (1). L'un de nous (2) a pu suivre de près l'évolution des formes en anneau, mais émettant un seul bourgeon, et de *gonidies* non annulaires à plusieurs bourgeons, chez le bacille tuberculeux. D'après Kahn (3), Almquist (4), Enderlein (5) et beaucoup d'autres (voire littérature dans Löhnis) [6], de telles formes font partie du cycle évolutif des microbes. Leur présence ne permet guère de déterminer la position systématique du microbe de l'agalaxie.

L'existence d'une gangue rappelant les zooglées, observée également par Löhnis (1) au cours de l'évolution des bactéries, ne peut non plus servir de critérium pour ranger le microbe de l'agalaxie parmi les champignons, ou parmi les bactéries.

Enfin, les éléments amorphes (photos n° 49, 57 et 58) ne donnent aucun point d'appui morphologique pour la classification.

Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, nous n'avons pas pu retrouver chez le microbe de l'agalaxie les formes filamenteuses qui permettent de rapprocher le microbe de la péri-pneumonie des champignons.

Bridré et Donatien ont constaté que la morphologie des microbes de l'agalaxie et de la péri-pneumonie est exactement semblable et que leurs propriétés biologiques ont des caractères communs. Nous pouvons le confirmer, sauf quelques divergences, par exemple le fait qu'on ne retrouve pas dans les cultures du microbe de l'agalaxie le développement d'un mycélium.

En résumé, le microbe de l'agalaxie contagieuse appartient

(1) LÖHNIS. *Journ. Agricult. Res.*, 6, n° 18, 1916.

(2) LOMINSKI. *Loco citato*.

(3) KAHN. *Amer. Revue Tuberc.*, 20, p. 45, 1929.

(4) ALMQUIST. *Zbl. Bakter.*, 1, Orig., 37, p. 48, 1904 ; ALMQUIST. *Journ. Inf. Dis.*, 31, p. 483, 1922.

(5) ENDERLEIN. *Bakterien-Cyclogenie*, Berlin, 1925.

(6) LÖHNIS. *Nat. Acad. Science*, 16, 2^e Memor., 1921.

au même groupe que le microbe de la péripneumonie, groupe qui jusqu'à présent ne se compose que de ces deux microbes.

De même que pour le microbe de la péripneumonie, l'élément principal du microbe de l'agalaxie semble être un *granule* (*corpuscule élémentaire*) en forme de coccus. Il est entouré d'une *gangue* qui lui confère des aspects divers, simulant souvent des filaments mycéliens et parfois des ramifications.

Dans la multiplication du microbe (outre la division simple), le bourgeonnement des éléments que nous avons identifiés à des *gonidies* semble jouer un rôle important. Il existe dans les cultures deux types de gonidies. L'un sous la forme de corpuscules non colorés, donnant l'impression *d'anneaux*. L'autre sous la forme de *granules*, en général plus petits que les gonidies du premier type, fortement colorés. Les gonidies émettent d'ordinaire plusieurs *bourgeons* qui ne dépassent pas une certaine longueur et ne donnent pas de mycélium.

Il faut remarquer qu'il semble n'exister aucune succession ordonnée des divers éléments du microbe de l'agalaxie dans la culture. On retrouve d'habitude après un court stade initial presque toutes les formes en même temps, quel que soit l'âge de la culture.

La forme du microbe peut-être la plus commune sur les préparations de cultures plus âgées est celle de *petits grumeaux* irréguliers, de *fragments*, de *débris*, de *brins*, etc., faiblement colorés, où l'on n'observe aucune structure organisée. Il n'est pas possible de se rendre exactement compte du mode par lequel ces éléments ont pris naissance. *L'hypothèse que le corps du microbe de l'agalaxie possède dans certains stades de son évolution une consistance semi-liquide*, qui rend son protoplasme très plastique, s'émettant facilement en petits fragments informes, faciliterait la compréhension des diverses formes si difficiles à définir qu'on retrouve dans les cultures et permettrait, peut-être, d'expliquer sa filtrabilité.

Nos cultures du microbe de l'agalaxie proviennent de l'Institut Pasteur. C'est pour nous un devoir très agréable que d'exprimer à l'Institut notre sincère reconnaissance pour avoir bien voulu nous les confier.

LÉGENDE DE LA PLANCHE II *bis.*

Les microphotographies reproduisent les préparations obtenues de cultures sur bouillon-sérum. Elles ont été prises au grossissement de 3.000 et reproduites sans la moindre retouche.

Phot. 1. — Formes en cocci. Plusieurs éléments réunis par une substance faiblement teintée. Coloration de Löffler. Culture de deux jours. Souche Alger.

Phot. 2. — Corpuscules protoplasmiques fortement colorés répandus sur un fond composé de nombreux grumeaux faiblement colorés. Coloration de Löffler. Culture de six jours. Souche Alger.

Phot. 3. — *Idem* que la photo 1. Coloration au Giemsa.

Phot. 4. — Globules incolores, dont chacun porte à sa périphérie un granule rond et un corpuscule semilunaire bien colorés. Coloration de Löffler. Culture de dix jours. Souche Alger.

Phot. 5. — Anneau à centre incolore portant une intumescence et un petit anneau cerclé par trois granules. Coloration de Löffler. Souche Alger. Culture de dix jours.

Phot. 6. — Trois globules incolores entourés d'un protoplasma fortement teinté, réunis en une petite chaînette. Culture de quatre jours. Coloration de Löffler. Souche Albanie.

Phot. 7. — Figure semblable à la précédente, mais au bord de l'anneau, en bas, sont visibles de toutes petites protubérances. Culture de dix jours. Coloration de Löffler. Souche Alger.

Phot. 8. — Grumeau protoplasmique incolore entouré d'un protoplasma bien coloré formant des petits bourgeons. Coloration de Löffler. Culture de dix jours. Souche Alger.

Phot. 9. — Image semblable à celle de la photo 8. Culture de quatre jours. Coloration de Löffler. Souche Alger.

Phot. 10. — Image semblable à celles des photos 8 et 9, seulement les bourgeons sont plus développés. L'anneau semble encore adhérer à un rameau. Coloration au Ziehl, décoloration à l'acide chlorhydrique à 1/1.000. Culture de trois jours. Souche Alger.

Phot. 11. — Petit anneau rond. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Alger.

Phot. 12. — Image semblable à celle de la photo 11. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Albanie.

Phot. 13. — Deux anneaux avec des bourgeons. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Albanie.

Phot. 14. — Anneau avec des bourgeons; le plus long terminé par une intumescence. Coloration de Löffler. Culture de dix jours. Souche Alger. En bas, à droite, un élément ovoïde, recouvert d'un corpuscule fortement coloré comme sur la photo 25.

Phot. 15. — Anneau encerclé par quelques granules. Un petit bourgeon et un rameau plus long à l'extrémité duquel l'anneau semble s'être formé. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Espagne.

Phot. 16. — Anneau portant à sa périphérie quelques granules et bourgeons granuleux. Coloration de Möller (même décoloration que pour le Ziehl). Culture de sept jours. Souche Alger.

Phot. 17. — Grand anneau avec des bourgeons et plusieurs granules. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Alger.

Phot. 18. — Corpuscule fortement coloré avec quelques bourgeons. Coloration au Giemsa. Culture de cinq jours. Souche Alger.

Phot. 19. — Large anneau; à son pourtour quatre granules fortement colorés. L'anneau semble être attaché à un élément allongé dont on voit encore les traces. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Alger.

Phot. 20. — Elément longitudinal portant un corpuscule. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Espagne.

Phot. 21. — Corpuscules protoplasmiques dont l'un porte deux, l'autre trois bourgeons. En bas, à droite, une forme en diplocoque dont un élément plus grand (élément mère?) est plus fortement coloré. Coloration de Löffler. Culture de dix jours. Souche Alger.

Phot. 22. — Corpuscule avec quatre bourgeons dont le quatrième, à peine visible, porte un granule à son extrémité. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 23. — Corpuscule avec cinq bourgeons dont l'un, dirigé en dehors, semble en perspective raccourci. Coloration de Löffler. Culture de neuf jours. Souche Alger.

Phot. 24. — Formes annulaires avec des bourgeons en amas, entourées de débris protoplasmiques. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Alger.

Phot. 25. — Grumeau protoplasmique faiblement teinté, recouvert d'un élément semilunaire fortement coloré. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Albanie.

Phot. 26. — Corpuscule protoplasmique portant trois corpuscules plus fortement colorés à sa périphérie. Culture de quatre jours. Coloration de Löffler. Souche Alger.

Phot. 27. — Petits corpuscules et grumeaux protoplasmiques rangés en fils et réunis par la substance gangueuse. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Alger.

Phot. 28. — Corpuscules et grumeaux protoplasmiques fortement colorés, enveloppés d'une substance protoplasmique faiblement teintée et rangés en pseudo-filament ramifié. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Albanie.

Phot. 29. — Gangue protoplasmique contenant des corpuscules fortement colorés, rangés en ramifications. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Espagne.

Phot. 30. — Grumeau protoplasmique incolore entouré d'un protoplasma coloré en forme de fauille avec des bourgeons. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 31. — Deux grumeaux incolores entourés de protoplasma fortement coloré (anneaux) avec des bourgeons. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 32. — Corpuscules et grumeaux protoplasmiques ronds ou de forme irrégulière rangés dans une substance peu colorée. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 33. — Granules et fragments de pseudo-filaments. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Albanie.

Phot. 34. — Image semblable à celle de la photo précédente. Même coloration et même souche. Culture de six jours.

Phot. 35. — Image semblable à celle de la photo 32. Coloration de Ziehl. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 36. — Image semblable à celles des photos 32 et 33. Il y a plus de gangue que sur les précédentes. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Albanie.

Phot. 37. — Pseudo-filament protoplasmique faiblement teinté et ramifié. Le tableau donne très bien l'impression d'une gangue semi-liquide enfermant des grumeaux plus solides. Coloration de Löffler. Culture de cinq jours. Souche Espagne.

Phot. 38. — Corpuscules entourés par la gangue et rangés en filaments. Coloration de Ziehl. Culture de six jours. Souche Espagne.

Phot. 39. — Amas et pseudo-filaments formés par la gangue, contenant des corpuscules. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Espagne.

Phot. 40. — Corpuscules et grumeaux libres et enfermés dans la gangue qui forme des filaments. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Alger.

Phot. 41. — Pseudo-filament formé par la gangue. Les filaments ramifiés contiennent des nombreux corpuscules. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Albanie.

Phot. 42. — Image semblable à celle de la photo précédente. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Alger.

Phot. 43. — Ramification du même genre que les précédentes; Coloration de Ziehl. Culture de dix jours. Souche Alger.

Phot. 44. — Corpuscules et grumeaux protoplasmiques libres et renfermés dans la gangue. Coloration de Löffler. Culture de huit jours. Souche Espagne.

Phot. 45. — Image semblable à celle de la photo 37. Coloration de Ziehl. Culture de trois jours. Souche Espagne.

Phot. 46. — Tableau semblable au précédent. Coloration de Löffler. Culture de cinq jours. Souche Espagne.

Phot. 47. — Image semblable à celle des photos 37 et 45. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Alger.

Phot. 48. — Corpuscules et grumeaux plongés dans une substance (gangue) protoplasmique faiblement colorée. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Alger.

Phot. 49. — Corpuscules, grumeaux et débris protoplasmiques de diverses grandeurs et formes plongés dans une substance peu colorée (gangue). Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Albanie.

Phot. 50. — Amas protoplasmiques fortement colorés, semblant contenir quelques petits anneaux comme ceux des photos 11 et 12. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Espagne.

Phot. 51. — Corpuscules protoplasmiques fortement colorés, réunis en forme de ramification. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 52. — Agglomération de gros corpuscules fortement colorés, agglutinés en masse presque uniforme. Coloration de Löffler. Culture de sept jours. Souche Albanie.

Phot. 53. — Corpuscules et grumeaux dans une masse gangueuse. Coloration de Ziehl. Culture de sept jours. Souche Albanie.

Phot. 54. — Petits corpuscules protoplasmiques réunis par la gangue en amas et en chaînette. Image rappelant les photos 37 et 47. Coloration de Löffler. Culture de douze jours. Souche Alger.

Phot. 55. — Corpuscules accouplés et en amas. Quelques formes en diplocoque semblent se trouver à l'état de division. Coloration de Löffler. Culture de trois jours. Souche Albanie.

Phot. 56. — Image semblable à celle de la photo précédente. Coloration de Löffler. Culture de dix jours. Souche Albanie.

Phot. 57. — Petits grumeaux, corpuscules et fragments protoplasmiques. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Alger.

Phot. 58. — Grumeaux et agglomération de différents éléments. Coloration de Löffler. Culture de quatre jours. Souche Albanie.

Phot. 59. — Colonie sur gélose-sérum. En forme de tête de clou. Le noyau épais de la colonie est enfoncé profondément dans le milieu.

Phot. 60. — Colonie semblable.

Phot. 61. — Une colonie semblable avec noyau moins développé.

Phot. 62. — Section verticale d'une colonie. La surface de la colonie est au même niveau que la surface du milieu qui est marqué sur la photographie par une fine ligne. On voit très bien que le centre de la colonie entre profondément dans le milieu.

ERRATA

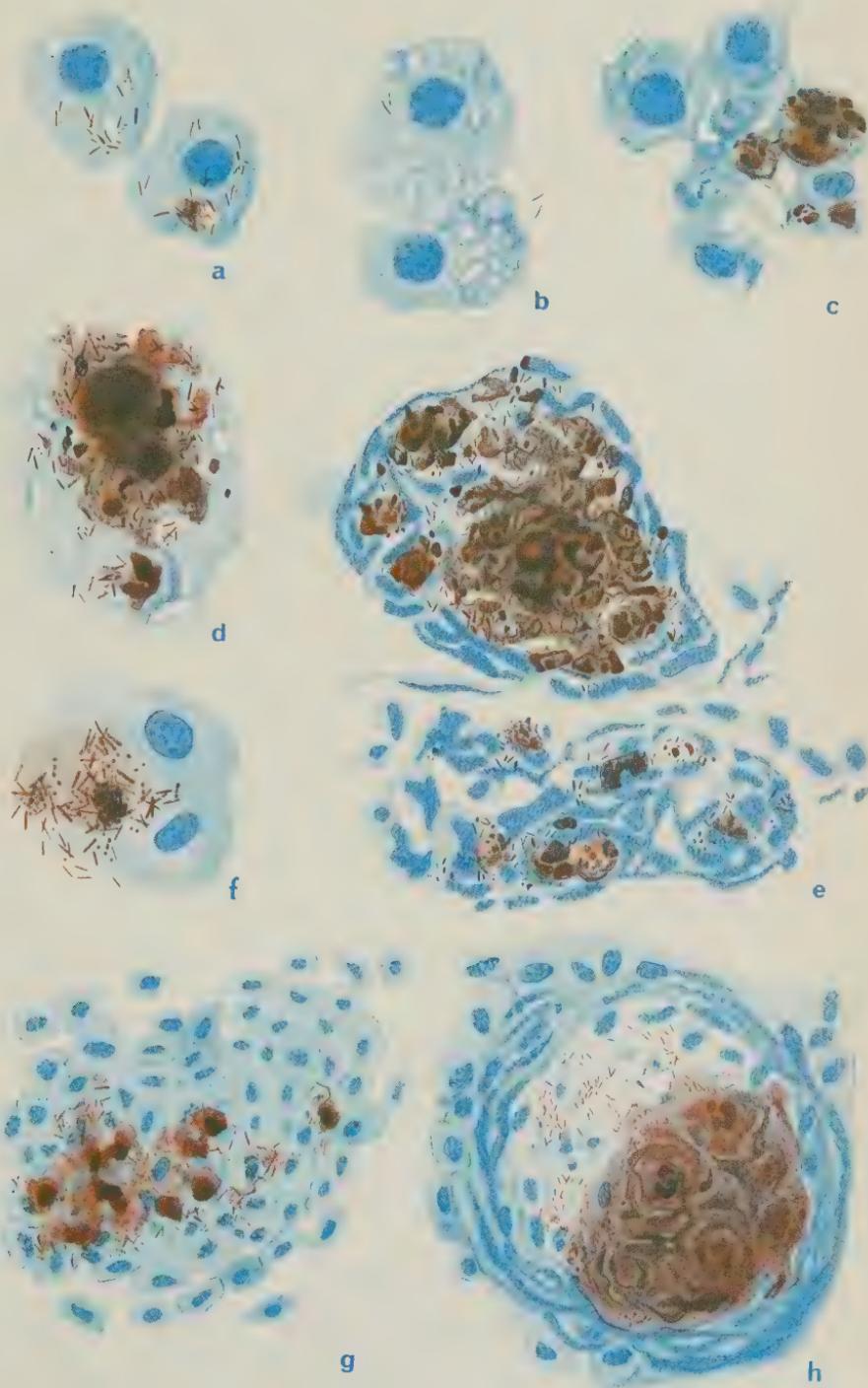
(MÉMOIRE MEYERHOF. — N° 3, septembre 1934.)

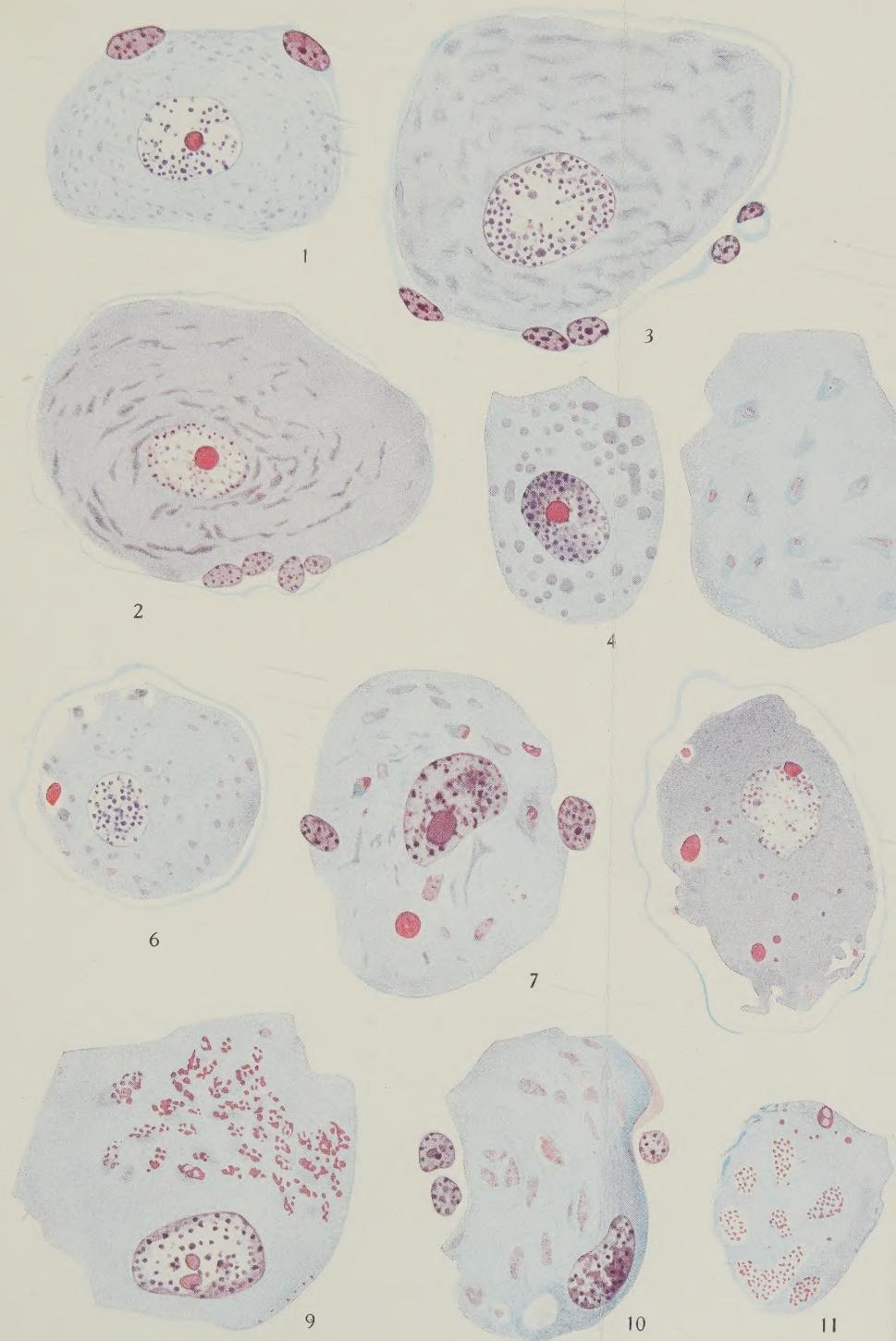
Page 230 : 5^e ligne au-dessous de la figure 1. *Lire : 1/400 au lieu de 4/100.*

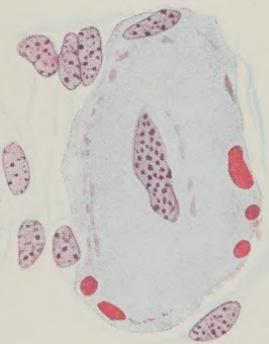
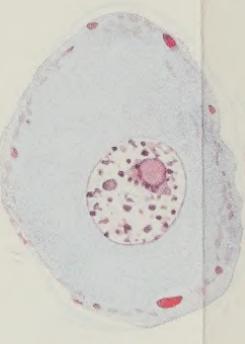
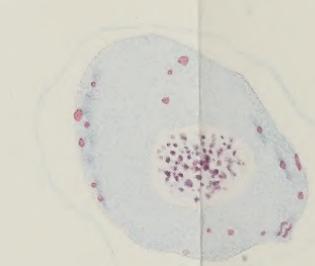
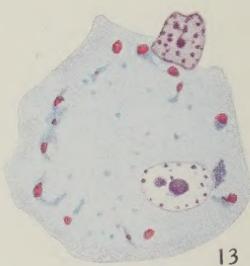
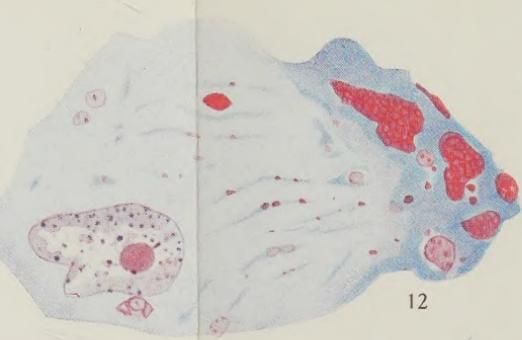
Page 231 : 6^e ligne à compter du bas de la page. *Lire : dioxyacétonephosphate au lieu de dioxyacétone.*

Page 239 : 3^e ligne au-dessous de la figure 5. *Lire : transformation en acide phosphoglycérique au lieu de transformation de l'acide phosphoglycérique.*

Le Gérant : G. MASSON.



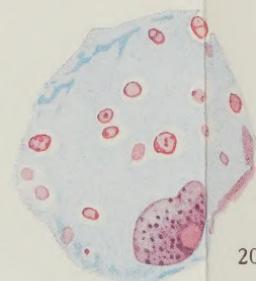




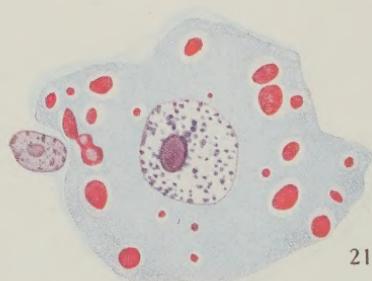
18



19



20



21



22

